

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Marianne Neves Manjavachi

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA HIPERNOCICEPÇÃO
MECÂNICA MUSCULAR INDUZIDA PELA INTERLEUCINA-6
(IL-6) EM CAMUNDONGOS**

Florianópolis
2010

Marianne Neves Manjavachi

**MECANISMOS ENVOLVIDOS NA HIPERNOCICEPÇÃO
MECÂNICA MUSCULAR INDUZIDA PELA INTERLEUCINA-6
(IL-6) EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Farmacologia
do Centro de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. João Batista
Calixto

Co-orientador: Dr. Emerson Marcelo
Motta

Florianópolis
2010

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

M278m Manjavachi, Marianne Neves

Mecanismos envolvidos na hipernocicepção mecânica
muscular induzida pela Interleucina-6 (IL-6) em camundongos
[dissertação] / Marianne Neves Manjavachi ; orientador,
João Batista Calixto. - Florianópolis, SC, 2010.
75 p.: il., grafs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Dor. 3. Muscular. 4. Citocinas.
5. Interleucina-6. I. Calixto, João Batista. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

AGRADECIMENTOS

Meu especial agradecimento a:

Professor João Batista Calixto, pela oportunidade de sua orientação, conhecimentos ofertados e principalmente pelo grande exemplo de dedicação e amor a ciência.

Emerson M. Motta, meu tutor, pela confiança, incentivo, dedicação e parceria no desenvolvimento deste trabalho, sobretudo, por sua amizade.

Daniela Leite, pelas suas valiosas considerações e parceria na realização deste trabalho, e também pela amizade.

Minha amiga, Denise Mollica Marotta, pelas idéias iniciais deste trabalho. Agradeço pela amizade sincera e pelo apoio em todos os momentos.

Professor Carlos Amilcar Parada e Professor Adair R. S. Santos, pela disponibilidade de participar da minha banca examinadora. Certamente, seus conhecimentos irão engrandecer este trabalho.

Professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, por terem contribuído na minha formação.

Amigos do LAFEX, pela convivência e aprendizado diário.

Aline Venâncio, Juliana Gonçalves e Pedro, pelo suporte técnico durante estes anos.

CNPq, pelo apoio financeiro, pelo apoio financeiro.

Meus pais, Cleide e Ademir, pela confiança, apoio e esforços infindáveis. Obrigada por sempre acreditarem em mim e em meus sonhos.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi investigar os possíveis mecanismos e mediadores envolvidos na hipernocicepção mecânica muscular induzida pela administração intramuscular (i.m.) de IL-6, no músculo gastrocnêmio de camundongos. Foi demonstrado que a injeção i.m. de IL-6 (3, 6 ou 10 ng/sítio) reduziu significativamente o limiar da resposta mecânica de maneira dose e tempo (1 - 6 h) dependentes em camundongos. Este efeito foi associado com aumento do recrutamento de células inflamatórias, como avaliado através da coloração H&E, além das atividades das enzimas MPO e NAG, e também com o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β e KC). Além disso, camundongos nocaute para TNFR1 $^{-/-}$, ou ainda os animais pré-tratados com o antagonista seletivo CXCR2, SB225002, ou com os anticorpos anti-macrófago, anti-TNF- α ou anti-KC, e ainda com o antagonista para o receptor para IL-1 (IL-1ra) demonstraram redução significativa da hipernocicepção mecânica induzida pela IL-6. Ademais, o tratamento sistêmico com inibidores de mediadores inflamatórios, como indometacina, celecoxibe, SC560, ou guanetidina, também reduziram a resposta nociceptiva causada pela administração i.m. de IL-6. A participação de diferentes vias de sinalização intracelular também foi observada, uma vez que o pré-tratamento local com inibidores de fosfolipase A₂ (PACOCF3), fosfolipase C (U73122), proteína quinase C (GF109203X), proteína quinase A (KT-5720), ou com fosfatidilinositol 3-quinase (AS605204), reduziram significativamente a hipernocicepção muscular induzida pela IL-6. Similarmente, o tratamento i.m. dos inibidores seletivos de p38 (SB203580), ERK (PD98059) ou JNK (SP60015) também inibiram a hipersensibilidade mecânica induzida pela IL-6. Ainda, ERK, JNK e p38 encontraram-se fosforiladas 5 minutos após a administração i.m. de IL-6. Estes resultados forneceram novas evidências que indicam papel relevante da IL-6 no desenvolvimento e na manutenção da hipernocicepção muscular em camundongos. Ainda, a hipersensibilidade mecânica muscular induzida pela parece promover ativação de células residentes, infiltração de células polimorfonucleares, produção de citocinas, prostanoídes e liberação de aminas simpaticomiméticas e ativação de vias intracelulares, especialmente MAPKs.

Palavras-chave: dor, dor muscular, citocinas, interleucina-6, MAPK.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate some mechanisms and mediators underlying the mechanical muscle hypernociception induced by intramuscular (i.m.) injection of IL-6 in the mice's gastrocnemius muscle. Here we show that the injection of IL-6 (3, 6 or 10 ng/site, i.m.) into mice gastrocnemius muscle evoked a time- and dose-dependent mechanical hypernociception (1 – 6 h) when assessed by Randall-Selitto apparatus. These effects were associated with increased inflammatory cell recruitment, as assessed of H&E stains, MPO and NAG activities, and with increased cytokines levels, namely TNF- α , IL-1 β and KC. TNFR1-/- mice or mice pre-treated with the selective CXCR2 antagonist, SB225002, with the anti-macrophage, anti-TNF- α or anti-KC antibodies or with IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) showed decreased IL-6-mediated mechanical hypernociception. Furthermore, systemic pre-treatment with inflammatory mediators inhibitor like indomethacin, celecoxib, SC560, or guanetidine, also prevented IL-6-induced muscle pain. Likewise, local pre-treatment with inhibitors of phospholipase A₂ (PACOCF3); phospholipase C (U73122), protein kinase C (GF109203X), protein kinase A (KT-5720), or with phosphatidylinositol 3-kinase (AS605204), also consistently diminished IL-6-induced muscle hypernociception. The intramuscular injection of the selective inhibitors of: p38 MAPK (SB203580), ERK (PD98059) or JNK (SP60015) also prevented IL-6-mediated muscular pain. Simultaneous flow cytometry measurement revealed that ERK, p38 MAPK and JNK were phosphorylated as early as 5 min after IL-6 injection. These findings provided new evidence indicating that IL-6 exerts a relevant role in the development and maintenance of muscular hypernociception in mice. The IL-6 mediated muscular pain response involves resident cell activation, polymorphonuclear cell infiltration, cytokine production, prostanoids and sympathomimetic amines release and the activation of intracellular pathways, especially MAPKs.

Key-words: pain, muscle pain, cytokines, interleukin-6, MAPK.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.m. de IL-6 no músculo gastrocnêmio de camundongos *Swiss*

Figura 2 - Efeito do tratamento com bloqueador de aminas simpáticas ou inibidores seletivos e não seletivos das ciclooxigenases sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela IL-6 no músculo gastrocnêmio de camundongos *Swiss*

Figura 3 - Hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.m. de Cg e seu efeito sobre a produção de IL-6 no músculo gastrocnêmio de camundongos *Swiss*

Figura 4 - Análise histológica do músculo gastrocnêmio 3 h após a injeção i.m. de IL-6

Figura 5 - Efeito da injeção i.m. de IL-6 sobre a infiltração de células inflamatórias no músculo gastrocnêmio de camundongos *Swiss*

Figura 6 - Efeito da administração i.m. de IL-6 sobre a produção de TNF- α , KC e IL-1 β no músculo gastrocnêmio de camundongos *Swiss*

Figura 7 - Envolvimento de citocinas pró-inflamatórias sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.m. de IL-6 em camundongos *Swiss*

Figura 8 - Vias de sinalização intracelular envolvidas na hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.m. de IL-6 em camundongos *Swiss*

Figura 9 - Envolvimento das MAPKs na hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.m. de IL-6 em camundongos *Swiss*

LISTA DE ABREVIATURAS

5-HT	5-hidroxitriptamina
AR	Artrite reumatóide
ASICS	Canais iônicos sensíveis a ácidos
ATP	Adenosina trifosfato
BK	Bradicinina
Cg	Carragenina
CNTF	Fator neurotrófico ciliar
CT-1	Cardiotrofina-1
COX	Ciclooxigenase
gp80	Glicoproteína de membrana 80
gp130	Glicoproteína de membrana 130
IASP	Associação Internacional para Estudo da Dor
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-6	Interleucina-6
IL-6R	Receptor de interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-11	Interleucina-11
IL-15	Interleucina-15
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
i.t.	Intratecal
KC	Quimiocina derivada de queratinócitos
kDa	Quilodalton
LIF	Fator inibitório de leucemia
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MCP-1	Proteína quimiotática e ativadora de monócitos
MPO	Enzima mieloperoxidase
NAG	Enzima N-acetilglucosaminidase
NF-kB	Fator nuclear kappa B
OSM	Oncostatina M
PGs	Prostaglandinas
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PKC	Proteína quinase C
PKA	Proteína quinase A
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PLC	Fosfolipase C

s.c.	Subcutâneo
SP	Substância P
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR1	Receptor 1 do TNF
TRPV1	Receptor de potencial transitório vanilóide tipo 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Dor	1
1.2 Dor muscular	4
1.3 Interleucina-6	7
2 OBJETIVOS	11
2.1 Objetivo geral	11
2.2 Objetivos específicos	11
3 MATERIAS E MÉTODOS	13
3.1 Animais	13
3.2 Indução da hipernocicepção inflamatória	13
3.3 Avaliação da hipernocicepção mecânica	13
3.4 Protocolo geral de administração de drogas	14
3.5 Tratamentos farmacológicos	14
3.6 Análise histológica	16
3.7 Atividade da enzima mieloperoxidase e N-acetilglucosaminidase	16
3.8 Dosagem de citocinas	16
3.9 Determinação da fosforilação de MAPK	17
3.10 Drogas e reagentes	17
3.11 Análise estatística	18
4 RESULTADOS	19
4.1 Hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.m. de IL-6 em camundongos	19
4.2 Envolvimento de mediadores inflamatórios na hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.m. de IL-6	21
4.3 Hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.m. de Cg e seu efeito sobre a produção de IL-6 em camundongos	23
4.4 Participação de células inflamatórias na hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.m. de IL-6	25
4.5 Participação de citocinas pró-inflamatórias na hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.m. de IL-6	28
4.6 Vias de sinalização intracelular envolvidas na hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.m. de IL-6	32
5 DISCUSSÃO	37
6 REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor

A dor enquanto modalidade sensorial de percepção constitui um sistema de alarme que tem o papel de proteger o organismo de uma lesão tecidual, através da ativação de mecanismos que envolvem vias ascendentes e descendentes (Hunt e Mantyh, 2001; Julius e Basbaum, 2001; Basbaum et al., 2009).

Atualmente, a dor é definida pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP) como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos que sugerem tal dano” (Loeser e Treede, 2008). Deste modo, a transmissão do sinal doloroso envolver a detecção de estímulos nocivos pelo sistema nervoso sensorial periférico quando receptores presentes nas terminações nervosas livres de fibras aferentes primárias (nociceptores) são ativados (Loeser e Melzack, 1999). No entanto, o processamento do sinal doloroso pelo sistema nervoso central esta sujeito a influência do componente emocional-afetivo do individuo (Russo e Brose, 1998; Julius e Basbaum, 2001). A relação entre a ativação dos nociceptores e a percepção da intensidade do sinal doloroso envolve um complexo processamento através das vias sensoriais e, a natureza altamente subjetiva da codificação deste sinal dificulta sua compreensão e seu tratamento clínico (Basbaum e Jessel, 2000). Sendo assim, se faz necessária a distinção entre os termos dor e nocicepção. Nocicepção refere-se somente aos processos neurais de codificação e processamento de estímulos nocivos (Loeser e Treede, 2008). De uma maneira geral, estes estímulos nocivos englobam o calor, o frio, a pressão, a distensão, os traumas, os estímulos químicos, dentre outros, que podem, direta ou indiretamente, ativar os nociceptores (Basbaum et al., 2009).

A sensação dolorosa é o resultado da ativação periférica de estruturas especializadas denominadas de terminações nervosas livres, as quais estão associadas às fibras aferentes primárias. Este sistema sensorial especializado está amplamente distribuído no organismo como, por exemplo, na pele, músculo, coração, articulação, cólon entre outros órgãos, que transmitem as informações nociceptivas da periferia para os neurônios secundários do corno dorsal na medula espinhal, pela liberação de neurotransmissores. Através de vias ascendentes, o estímulo nociceptivo é conduzido da medula espinhal para as áreas supra-espinhais, responsáveis pela codificação da informação dolorosa,

que incluem a formação reticular, o tálamo, e o córtex cerebral (Julius e Basbaum, 2001; Almeida et al., 2004; Basbaum et al., 2009).

Os impulsos gerados nas terminações nervosas são propagados por quatro categorias de neurônios sensoriais, classificados de acordo com o seu diâmetro, estrutura da fibra, e com a velocidade de condução do impulso nervoso gerado. As fibras sensoriais primárias do tipo A α e A β apresentam grande diâmetro, camada espessa de mielina, alta velocidade de condução (30-100 m/s), sendo normalmente responsáveis pela transmissão das informações proprioceptivas, como toque leve e pressão. Por outro lado, a transmissão da informação nociceptiva ocorre através da ativação de fibras A δ e C. As fibras A δ possuem diâmetro médio, fina bainha de mielina, e média velocidade de condução do estímulo nociceptivo (aproximadamente 12-30 m/s). Diferentemente, as fibras C são de pequeno diâmetro, amielinizadas e de baixa velocidade de condução do impulso nervoso (aproximadamente 0,5-2 m/s). A estimulação de fibras A δ promove resposta rápida que resulta na dor aguda, ou dor de primeira fase, que frequentemente desencadeia o reflexo de retirada, enquanto que a ativação de fibras C leva a uma resposta duradoura, responsável por dor difusa, geralmente secundária à dor aguda (para revisão, ver Julius e Basbaum, 2001; Almeida et al., 2004). A maioria das fibras C pode responder a todos os estímulos nocivos, ou seja, estímulos mecânicos, térmicos, ou químicos, e por esta razão são chamadas de fibras polimodais. As fibras polimodais possuem receptores termosensíveis ativados por estímulos térmicos (calor ou frio), mecanorreceptores de baixo limiar, e receptores específicos para substâncias algogênicas, tais como prostaglandinas (PGs), bradicinina (BK), serotonina (5-HT- 5-hidroxitriptamina), proteases e histamina, entre outras (Julius e Basbaum, 2001; Almeida et al., 2004).

Os corpos celulares das fibras aferentes primárias encontram-se nos gânglios da raiz dorsal (nervos espinhais) ou nos gânglios trigeminais (nervos cranianos). Estes neurônios são denominados pseudo-unipolares, pois além do ramo periférico possuem um ramo central que adentra o corno dorsal da medula espinhal. Nesta região, os neurônios aferentes primários fazem sinapse com neurônios de segunda ordem. O corno dorsal da medula espinhal é anatômico e eletrofisiologicamente dividido em laminas ou camadas. Os neurônios denominados nociceptivos encontram-se nas laminas I, II, V, VI e X da medula espinhal. As fibras A δ tem suas projeções nas laminas I e V do corno da raiz dorsal, enquanto as fibras C encontram-se mais superficialmente, nas laminas I e II (para revisão ver Basbaum et al., 2009).

Existem basicamente três diferentes tipos de dor, a dor transitória, aguda ou crônica. Na transitória, a ativação dos nociceptores acontece na ausência de qualquer dano tecidual, provavelmente eles têm como função proteger o organismo de lesões físicas pelo ambiente ou estresse dos tecidos. A dor aguda de maneira geral, a causa é bem definida e o curso temporal é delimitado, podendo desaparecer antes mesmo da remoção da causa ou reparo do dano tecidual. Entretanto, a dor crônica é geralmente causada por lesões ou doenças que superam a capacidade do organismo de reverter o quadro, podendo persistir até mesmo após o desaparecimento do trauma inicial, estendendo-se por meses ou anos e comprometendo a qualidade de vida do indivíduo (Loeser, 2003; Skøtt, 2003; para revisão ver Costigan et al., 2009).

Tanto a dor aguda quanto a dor crônica estão frequentemente associadas a processos inflamatórios, como resultado da lesão tecidual, reatividade imune anormal ou lesão nervosa (Stein et al., 2003). Na vigência de um processo inflamatório, mediadores químicos liberados devido à lesão tecidual ou ativação do sistema imune são os responsáveis pela sensibilização dos nociceptores (Millan et al., 1999). A sensibilização dos nociceptores é caracterizada pela diminuição do limiar de excitabilidade necessário para ativá-lo, pelo aumento da atividade espontânea da célula nervosa e pelo aumento na frequência de disparo em resposta a estímulos supralimiares (Costigan et al., 2009). É importante ainda salientar, que o processo de sensibilização não ocorre somente nas terminações periféricas, mas pode afetar toda a via da transmissão do sinal doloroso. Como consequência destas alterações dois fenômenos clínicos de grande relevância surgem como a hiperalgesia, que consiste em resposta exacerbada a estímulos dolorosos, e alodínia, na qual se observa o surgimento da dor em resposta a um estímulo normalmente inócuo. Duas destas alterações são conhecidas como hiperalgesia, que consiste em resposta exacerbada a estímulos dolorosos, e alodínia, na qual se observa o surgimento da dor em resposta a um estímulo normalmente inócuo (Loeser e Treede, 2008).

Dentre os diversos mediadores químicos que podem ativar diretamente e/ou indiretamente os nociceptores estão, por exemplo, a BK, substância P, endotelinas, PGs e aminas simpáticas entre outras. Estas duas últimas classes vêm sendo extensivamente estudadas e acredita-se que sejam os mediadores finais da dor inflamatória. No entanto, o estímulo inflamatório geralmente não libera diretamente estes mediadores, mas sua liberação é usualmente precedida por outros

mediadores como as citocinas (Ferreira et al., 1999; Cunha et al., 2005; Verri et al., 2006).

A maioria das citocinas apresenta múltiplas funções biológicas, como por exemplo, diferenciação, sobrevivência, crescimento e metabolismo celular bem como participam de processos inflamatórios e imunológicos. Além disso, já está bem estabelecido que as citocinas constituem uma ligação entre a lesão celular ou reconhecimento de substâncias pelo sistema imunológico e o desenvolvimento de manifestações inflamatórias locais ou sistêmicas (Hopkins, 2003; Cunha e Ferreira, 2003; Verri et al., 2006). Como já mencionado, a liberação dos mediadores finas da dor inflamatória é precedida pela liberação de citocinas. Sendo assim, durante o reconhecimento dos estímulos inflamatórios, células residentes (principalmente macrófagos, mastócitos e células dendríticas) e migratórias liberam diversos mediadores inflamatórios, destacando-se as citocinas, que desempenham papel essencial para o desenvolvimento da dor inflamatória, bem como em outros eventos inflamatórios. De fato, inúmeros estudos demonstram a participação destas citocinas no desenvolvimento da dor inflamatória e/ou crônica, e entre elas destacam-se a interleucina-1 β (IL-1 β), fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina-8 (IL-8), e a interleucina-6 (IL-6) (Cunha et al., 1992; Cunha et al., 2005; Quintão et al., 2006; Rocha et al., 2006; Uçeyler et al., 2009).

1.2 Dor muscular

A dor muscular é um dos mais freqüentes sintomas encontrados na prática clínica e responsável por causar grandes limitações funcionais na população adulta do que qualquer outro grupo de distúrbios patológicos (Woolf e Pfleger, 2003). Praticamente todos os indivíduos adultos já tiveram um ou mais episódios breves de dor muscular associada a uma lesão ou após um exercício físico (Crombie et al., 1999). No entanto, os mecanismos envolvidos neste tipo de dor ainda não estão totalmente elucidados, e acredita-se que existam algumas diferenças entre a dor muscular e a cutânea. (Kehl e Fairbank, 2003; Schäfers et al., 2003).

De uma maneira geral, a dor muscular é conseqüente de tensão repetitiva do músculo, uso excessivo, além de distúrbios musculoesqueléticos relacionadas com trabalho, e incluem várias manifestações que causam dor em ossos, músculos, tendões ou estruturas circundantes (Kramer et al. 2001). Sendo assim, a dor muscular pode ser aguda ou crônica, local ou difusa. A dor lombar é o tipo mais comum de dor muscular crônica, seguida de outros exemplos

como a tendinite, neuropatias, mialgia e fibromialgia. A prevalência da dor muscular é maior entre as mulheres e aumenta substancialmente com a idade. Ademais, a dor muscular e a incapacidade física ocasionada por tais condições musculoesqueléticas afeta social e psicologicamente o paciente, diminuindo a qualidade de vida do mesmo (Woolf e Pfleger, 2003).

A relevância de tal problema foi responsável para que a IASP anunciasse em outubro de 2009 o Ano Mundial Contra a Dor Muscular. Esta campanha foi considerada um passo importante para o estudo científico da dor muscular, uma vez que a mesma visa gerar uma maior consciência entre os pesquisadores, profissionais de saúde, líderes governamentais e o público-alvo em geral sobre a dor muscular e seu impacto substancial sobre os pacientes em todo o mundo (Gebhart, 2009).

Como já mencionado, a fisiopatologia da dor muscular não está completamente esclarecida, porém acredita-se que a mesma pode ser desencadeada por diversos fatores, como a lesão e degradação muscular, estímulos inflamatórios, exercício físico intenso, fibrose, e também distúrbios neuro-sensoriais (Inanici e Yunus, 2004; Loram et al., 2007).

Ainda que existam algumas semelhanças com a transmissão do estímulo da dor cutânea, evidências atuais indicam a ocorrência de uma via sensorial especializada na transmissão da dor muscular, que envolve fibras musculares, receptores de tendões, receptores cutâneos bem como a sensibilização central (Kehl e Fairbank, 2003). Além disso, a dor muscular é menos localizada do que a cutânea, uma explicação para tal fenômeno pode ser pelo fato de que o tecido muscular tem menor quantidade de nervos, quando comparado ao cutâneo (Mense, 2009). No músculo, os neurônios nociceptivos aferentes são principalmente dos grupos III e IV, que correspondem, em velocidade de condução e tamanho as fibras cutâneas aferentes A δ e C, respectivamente (para revisão ver Graven-Nielsen e Mense 2001, Kaufman et al., 2002; Hoheisel et al., 2005). Estes podem ser sensibilizados e ativados por estímulos mecânicos nocivos, como trauma ou sobrecarga mecânica, bem como por mediadores inflamatórios endógenos, incluindo a BK, serotonina e prostaglandina E₂ (PGE₂) (Mense, 2008).

Outras duas substâncias particularmente importantes na gênese da dor muscular são a adenosina trifosfato (ATP) e íons de hidrogênio (H⁺), uma vez que ambas são produzidas em diversas condições pelo tecido muscular (Mense, 2009). As células musculares apresentam concentração particularmente elevada de ATP quando comparada as demais células do organismo, devido à própria fisiologia do tecido

muscular. Além disso, qualquer dano ou aumento da permeabilidade de células musculares são acompanhados pelo aumento da liberação de ATP (Burnstock, 2007). Assim como o ATP, qualquer alteração fisiopatológica do tecido muscular está associada com a diminuição do pH intersticial, ou seja, aumento das concentrações de íons H^+ . Estudos recentes demonstraram a capacidade tanto do ATP como de íons H^+ em sensibilizar fibras nervosas musculares através da ligação com receptores expressos nas terminações nervosas. De maneira geral, o ATP ativa nociceptores musculares, principalmente pela ligação aos receptores purinérgicos P2X3, enquanto os íons H^+ , através da ligação com os canais de potencial transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1) e canais iônicos sensíveis a ácidos (ASICs) (Hoheisel et al., 2004; Light et al., 2008; para revisão ver Mense, 2009).

Embora, no passado, os estudos correlacionados ao entendimento das vias envolvidas na dor muscular podem ter sido prejudicados pela falta de modelos animais, nos últimos anos vários, grupos de pesquisadores vêm dando atenção ao desenvolvimento de novos modelos que avaliam especificamente a hipersensibilidade causada por estímulos nocivos no músculo (para revisão ver Kehl e Fairbanks, 2003; Arendt-Nielsen e Yarnitsky, 2009; Sluka et al., 2009). Das estratégias experimentais utilizadas para o estudo da dor muscular, a injeção intramuscular (i.m.) de substâncias algogênicas produz dados quantificáveis e clinicamente relevantes, semelhantes à hiperalgesia e a função motora alterada relatadas em humanos (Capra e Ro, 2004).

Apesar da importância no desenvolvimento e na manutenção da dor inflamatória ou neuropática, apenas as ações catabólicas de citocinas pró-inflamatórias têm sido associadas à patologia do tecido muscular. Em humanos, os níveis de citocinas estão aumentados em muitas condições musculares dolorosas, como por exemplo, na miopatia inflamatória (Lepidi et al., 1998; Lundberg et al., 2000) e na fibromialgia (Maes et al., 1999; Wallace et al., 2001). Como mencionado anteriormente, a intensidade da dor e do processo inflamatório estão intimamente correlacionados, sendo assim, faz-se necessário um maior entendimento da participação das citocinas inflamatórias na dor muscular. Estudos recentes demonstraram que as fibras musculares são capazes de produzir várias citocinas em resposta a contração muscular no exercício físico, atividade intimamente relacionada com o desenvolvimento da dor muscular. Entre estas citocinas destaca-se o aumento substancial na produção e na liberação de IL-6, interleucina-8 (IL-8), e interleucina-15 (IL-15). Ademais, o aumento dos níveis destas citocinas está relacionado à lesão muscular

resultante de intensas contrações musculares após a realização de uma atividade física (Steensberg et al., 2000; Rosendal et al., 2005; Pedersen et al., 2007; Gerdle et al., 2008).

Nos últimos anos, diversos trabalhos realizados em roedores têm demonstrado o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias na nocicepção muscular (Schäfers et al., 2003; Loram et al., 2007; Dina et al., 2008a). Loram e colaboradores (2007) demonstraram que a hipernocicepção mecânica muscular induzida pela injeção i.m. de um estímulo inflamatório inespecífico, carragenina (Cg), aumenta os níveis de diversas citocinas, entre elas a IL-6, que apresenta um aumento pronunciado dos seus níveis 6 - 24 h após a administração do estímulo no músculo gastrocnêmio de ratos (Loram et al., 2007). Corroborando estes achados, Ono e colaboradores (2007) verificaram que a expressão de RNA mensageiro da citocina IL-1 β estava aumentada em resposta a injeção de Cg no músculo masseter de ratos. Já em relação à expressão de RNA mensageiro da IL-6, foi observado aumento desta citocina tanto em resposta a injeção i.m. de Cg bem como em resposta a contração muscular causada pela estimulação elétrica repetitiva do músculo masseter de ratos.

1.3 Interleucina-6

Citocinas são polipeptídios, produzidas e liberadas por uma variedade de células, com múltiplas e complexas atividades. Elas são transientemente produzidas e geralmente têm um curto tempo de meia vida. Agem por intermédio de ligações a receptores específicos presentes nas superfícies celulares, tendo a rede funcional de citocinas um papel central na homeostase do sistema imune, de maneira que variações de suas concentrações fisiológicas podem levar a uma resposta imune anormal. Além disso, podem atuar ativando genes, que positiva ou negativamente controlam ou modulam a função de células alvos promovendo a divisão, o crescimento, a diferenciação, a migração e morte celular. As citocinas envolvidas no processo inflamatório são produzidas por tipos celulares diferentes, particularmente, pelas células mononucleares, atuando de forma complexa e coordenada, podendo estimular ou inibir sua própria síntese, assim como, de outras citocinas e de seus receptores (para revisão ver Vilcek e Feldmann, 2004).

A IL-6 é uma citocina multifuncional, cujo nível circulante é inferior ao de detecção em condições fisiológicas, porém alguns estímulos patológicos e inflamatórios produzem uma rápida produção e/ou liberação desta citocina. Juntamente com a IL-1 β e o TNF- α , a IL-6 é uma das principais citocinas pró-inflamatórias, embora ações

antiinflamatórias também sejam aludidas a ela. A IL-6 é uma glicoproteína com peso molecular de 21 a 28 quilodaltons (kDa), dependendo de sua origem celular (Kishimoto, 2004). Dentre as células que a produzem estão os monócitos/macrófagos, fibroblastos e células do endotélio vascular, o que indica seu papel na modulação do sistema imune. Entre outras células que produzem a IL-6 estão os queratinócitos, osteoblastos, células T, células B, neutrófilos, eusínófilos, mastócitos, fibras musculares lisas e esqueléticas e células do tecido adiposo (Febbraio e Pedersen, 2002). Sabe-se que esta citocina, desempenha múltiplas ações, sendo as mais relevantes na inflamação, hematopoiese e na diferenciação de células T e B (Fonseca et al., 2009).

Clonada em 1986, a IL-6 é um membro de uma família que incluem a interleucina-11 (IL-11), fator inibitório de leucemia (LIF), oncostatina M (OSM), fator neurotrófico ciliar (CNTF) e cardiotrofina-1 (CT-1), uma vez que estas utilizam do mesmo receptor de superfície, a glicoproteína de membrana 130 (gp130) (Gadient e Otten, 1996; Kishimoto, 2004). As ações mediadas pela IL-6 devem-se a sua ligação a um receptor de membrana específico, o receptor de IL-6 (IL-6R), também conhecido como glicoproteína de membrana 80 (gp80), que induz posteriormente a homodimerização da gp130, formando um complexo que finalmente gera a transdução do sinal. Além do IL-6R de membrana, existe também a forma solúvel deste receptor que pode ser liberado a partir da superfície da célula em uma forma ativa e confere sensibilidade para os ligantes às células que não expressam a unidade solúvel, mas sim o componente gp130 (März et al., 1999; para revisão ver Heinrich et al., 2003; Kishimoto, 2004).

As vias de sinalização intracelular pelas quais a IL-6 exerce seus efeitos incluem a ativação de duas principais vias, a via de sinalização JAK/STAT3 e das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) (Heinrich et al., 2003), embora esta última parece ter pouca relevância para a sinalização da IL-6 em condições fisiológicas. Esta via alternativa, porém, compartilha de proteínas intracelulares que parecem estar envolvidas na potencialização da dor (De Jongh et al., 2003). Além disso, estudos recentes demonstraram que a IL-6 ativa PI3k/Akt (Ohbayashi et al., 2007) e o fator nuclear kappa B (NF-kB) (Lee et al., 2007), ambas podendo ocorrer de forma concomitante ou independente da via de sinalização JAK/STAT3.

Em relação ao envolvimento da IL-6 nos mecanismos inflamatórios, sabe-se que esta é fundamental na amplificação da fase aguda da inflamação. De fato, a IL-6 estimula a produção de proteínas

da fase aguda da inflamação, particularmente a Proteína C Reativa, um dos principais marcadores da resposta inflamatória (Gabay, 1995), e induz a leucocitose, febre e angiogênese. Ademais, a IL-6 contribui na transição para a fase crônica da inflamação pelo acúmulo de células mononucleares no local da lesão, através da contínua secreção de proteína quimiotática e ativadora de monócitos (MCP-1), bem como por participar na angioproliferação e funções anti-apoptóticas das células T (Fonseca et al., 2009). Em relação a sua relevância em estados patológicos, a IL-6 é uma citocina de papel fundamental no que diz respeito aos mecanismos patogênicos das artrites em geral. Altos níveis de IL-6 são produzidos nas articulações de pacientes com artrite reumatóide (AR), acompanhado de aumento substancial dos níveis desta citocina no soro, sendo assim, estes achados contribuíram para que o aumento da liberação de IL-6 pode ser responsável por sinais locais e sistêmicos, e ainda aos sintomas em pacientes com AR (Lipsky, 2006). Muitos dos modelos animais utilizados para se investigar os mecanismos envolvidos na artrite (artrite induzida por colágeno, artrite induzida por antígeno, artrite adjuvante) parecem ser dependentes da participação da IL-6 (Nishimoto e Kishimoto, 2006). Takagi et al. (1998), demonstraram que o tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-6R inibe o desenvolvimento da artrite induzida por colágeno em roedores, de uma maneira dose dependente, e sugeriram que tal efeito fosse devido pela supressão das vias intracelulares ativadas pela IL-6. Vale ressaltar que recentemente foi aprovado o uso do anticorpo monoclonal anti-IL-6R humanizado para o tratamento de pacientes com artrite reumatóide (Zídek et al., 2009).

Apesar dos inúmeros estudos referentes principalmente a participação da IL-6 em processos inflamatórios e no sistema imune, estudos recentes evidenciam o papel desta citocina no desenvolvimento da hipernocicepção inflamatória. Cunha e colaboradores (1992) demonstraram que uma cascata de citocinas, entre elas a IL-6, medeia a hipernocicepção inflamatória mecânica em ratos. Além disso, observou-se que a injeção intraplantar (i.pl.) de IL-6 causa hipernocicepção mecânica dose e tempo dependente, e que esta medeia a liberação local de IL-1 β , o que leva a liberação de PGs (Cunha et al., 1992). Corroborando com o papel hipernociceptivo da IL-6, animais com deleção do gene para esta citocina apresentaram redução na hipernocicepção térmica e mecânica em resposta à administração i.pl. de Cg (Xu et al., 1997). Adicionalmente, DeLeo e colaboradores (1996) demonstraram que a administração intracerebroventricular (i.c.v.) e intratecal (i.t.) de IL-6 induziu hipernocicepção em ratos, além disso,

inúmeros estudos relataram o aumento da produção da IL-6 em diferentes modelos de dor neuropática (para revisão ver De Jongh et al. 2003).

Recentemente, frente às inúmeras evidências em torno do papel nociceptivo bem como a participação da IL-6 no metabolismo do músculo esquelético, Dina e colaboradores (2008a) demonstraram que a injeção i.m. de IL-6 no músculo gastrocnêmio de ratos diminuiu de maneira pronunciada o limiar nociceptivo mecânico. Os mesmo autores ainda verificaram que a injeção i.m. de IL-6 induziu hipernocicepção mecânica crônica latente que foi desencadeada após a administração i.m. de PGE₂ (Dina et al., 2008a).

Apesar dos inúmeros estudos e evidências que apóiam um papel relevante exercido pela IL-6 em diferentes condições dolorosas, os mecanismos através dos quais esta citocina induz a dor muscular são ainda pouco compreendidos. Sendo assim, o presente estudo procurou caracterizar, por meio de diferentes ferramentas farmacológicas e bioquímicas, os possíveis mecanismos envolvidos na hipernocicepção mecânica muscular induzida pela administração i.m de IL-6, quando administrada no músculo gastrocnêmio de camundongos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os possíveis mecanismos celulares e intracelulares envolvidos na hipernocicepção mecânica muscular induzida pela administração i.m de IL-6 no músculo gastrocnêmio de camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o perfil dose e tempo resposta da hipernocicepção mecânica desencadeado pela injeção i.m. de IL-6 no músculo gastrocnêmio de camundongos;
- Comparar a resposta comportamental à estimulação mecânica nociva do músculo gastrocnêmico desencadeada pela injeção i.m. de um estímulo inflamatório inespecífico, e se este estímulo produz IL-6 no músculo gastrocnêmio de camundongos;
- Analisar a participação de células inflamatórias no desenvolvimento da hipernocicepção mecânica muscular induzida pela IL-6, através do emprego de ferramentas farmacológicas e bioquímicas;
- Avaliar a participação de citocinas pró-inflamatórias na hipernocicepção mecânica muscular induzida pela IL-6 através do emprego de ferramentas farmacológicas e bioquímicas, ou ainda pelo uso de animais com deleção gênica;
- Caracterizar as vias de sinalização intracelular envolvidas na hipernocicepção mecânica muscular induzida pela IL-6, pelo emprego de diferentes estratégias farmacológicas e bioquímicas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos das linhagens *Swiss* (30-40 g) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e, C57BL/6 (25-30 g), criados no biotério do Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX) do Departamento de Farmacologia/CCB - UFSC. Além disso, em alguns experimentos foram utilizados camundongos machos com deleção gênica para o receptor do TNF- α (TNFR1-/-), criados no biotério do LAFEX. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade (60 - 80%) e luminosidade (ciclo de claro/escuro de 12 horas) controladas. Água e ração foram providas ad libitum, exceto durante os procedimentos experimentais. Os animais permaneceram no laboratório a temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) durante um período de adaptação de pelo menos 1 h antes da realização dos testes comportamentais, realizados geralmente entre 8 e 16 h.

Os experimentos descritos foram conduzidos de acordo com as recomendações do Guia de Uso e Cuidado com Animais Laboratoriais do National Institutes of Health dos Estados Unidos da América (NIH Publication No. 85-23, revisado em 1996). Todos os procedimentos empregados no presente estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (número de protocolo 045/CEUA/PRPe/2008). O número de animais e a intensidade do estímulo nocivo utilizado foram os mínimos necessários para demonstrar os efeitos dos tratamentos com as drogas.

3.2 Indução da hipernociceção inflamatória

Os animais foram anestesiados com isoflurano (2% em 100% de O₂, durante 3 min.) e receberam injeção i.m. unilateral de IL-6 (3, 6 ou 10 ng/sítio), Cg (30, 100 ou 300 $\mu\text{g/sítio}$) ou veículo (10 μl de salina) no músculo gastrocnêmio direito. Após a indução da hipernociceção inflamatória os animais foram avaliados através de a estimulação mecânica descrita a seguir.

3.3 Avaliação da hipernociceção mecânica

A avaliação do limiar nociceptivo mecânico foi realizada de acordo com a metodologia proposta originalmente por Schäfers e colaboradores (2003), com algumas modificações. A hipernociceção mecânica foi avaliada em diferentes intervalos de tempos (1 - 24 h) após a injeção i.m. dos diferentes agentes inflamatórios, através do emprego de um analgesímetro (Ugo Basile, Itália) e expresso em gramas de

acordo com o método descrito por Randall e Selitto (1957). Foi aplicada uma pressão que aumenta linearmente (16 g/s) através de um cone sobre o músculo gastrocnêmio até a sua resposta flexora de retirada. O valor registrado foi considerado como o limiar de retirada do músculo ao estímulo mecânico e expresso como limiar mecânico (g). Todos os animais foram avaliados para determinar o limiar mecânico basal (150 - 200 g) antes dos tratamentos. Reduções significativas no limiar de resposta basal do músculo gastrocnêmio à estimulação mecânica caracterizam o surgimento de hipernocicepção mecânica.

3.4 Protocolo geral de administração de drogas

De acordo com cada protocolo experimental, diferentes grupos de animais foram previamente tratados, com diversos inibidores ou antagonistas, por diferentes vias de administração, antes da aplicação dos agentes inflamatórios. Os animais controle receberam o veículo correspondente a cada droga, de acordo com protocolo utilizado. Os tratamentos pela via intraperitoneal (i.p.) foram realizados 30 min antes da injeção do estímulo. As drogas administradas pela via subcutânea (s.c.) foram aplicadas 1 h antes da injeção dos estímulos. Os tratamentos locais foram realizados 5 minutos antes dos estímulos. As doses dos inibidores, antagonistas e anticorpos, ou os protocolos de tratamento, foram escolhidos baseados em estudos pilotos ou publicações prévias do nosso grupo (Ferreira et al., 2005; Motta, et al., 2006; Marotta et al., 2009; Manjavachi et al., 2010).

3.5 Tratamentos farmacológicos

Para verificar a participação de aminas simpatomiméticas na hipernocicepção mecânica induzida pela IL-6 (6 ng/sítio, i.m.) em camundongos *Swiss*, diferentes grupos de animais foram pré-tratados por via s.c. com guanitidina (30 mg/kg) antes do estímulo nociceptivo inflamatório. Animais do grupo controle receberam solução salina (10 ml/kg, s.c., 1 h).

A participação de produtos da via do ácido araquidônico na hipernocicepção mecânica induzida pela IL-6 (6 ng/sítio, i.m.) foi avaliada pelo pré-tratamento com indometacina (5 mg/kg, i.p.), e os inibidores seletivos das enzimas COX-1, SC560 (5 mg/kg), ou COX-2, celecoxibe (10 mg/kg), administrados pelas vias i.p. (30 min antes). Os animais do grupo controle receberam os respectivos veículos: salina (10 ml/kg, i.p., 30 min), salina com 1% de Tween-80 (10 ml/kg, i.p., 30 min).

Para verificar a influência da migração de neutrófilos e a participação macrófagos na hipernocicepção mecânica induzida pela IL-6 (6 ng/sítio, i.m.), diferentes grupos de camundongos *Swiss* foram pré-tratados por via i.p. com o antagonista seletivo de receptores CXCR2, SB225002 (1 mg/kg, i.p., 30 min), ou com anticorpo anti-macrófago (50 µg/kg, i.p., 30 min), respectivamente. Os animais do grupo controle receberam solução salina com 1% de Tween-80 (10 ml/kg, i.p., 30 min) ou somente salina (10 ml/kg, i.p., 30 min).

A fim de verificar o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias na hipernocicepção mecânica induzida pela IL-6 (6 ng/sítio, i.m.) em camundongos *Swiss*, diferentes grupos de animais foram pré-tratados localmente com o anticorpo anti-TNF- α (100 ng/sítio, i.m.), antagonista de receptor da interleucina-1 β (IL-1RA) (500 ng/ sítio, i.m.), ou com anticorpo anti-KC (100 ng/sítio, i.m.), 5 minutos antes da administração i.m. de IL-6. Os animais do grupo controle receberam injeção i.m. de solução salina (10 µl, 5 min). Para avaliar a relevância da citocina TNF- α na hiperalgesia mecânica induzida pela IL-6 (6 ng/sítio, i.m.), foram utilizados animais com deleção gênica do TNFR1 e seu respectivo camundongo controle, C57/BL6. Os animais controle receberam i.m de solução salina.

A fim de verificar as vias de sinalização intracelulares envolvidas na hipernocicepção mecânica induzida pela IL-6 (6 ng/sítio, i.m.), diferentes grupos de camundongos *Swiss* foram pré-tratados com inibidores de: fosfolipase A₂ (PLA₂) - PACOCF3 (1 nmol/ sítio, i.m.); fosfolipase C (PLC) - U73122 (30 pmol/sítio, i.m.); proteína quinase C (PKC) - GF1090203X (1 nmol/sítio, i.m.); proteína quinase A (PKA) - KT-5720 (3 nmol/sítio, i.m.); fosfatidilinositol quinase (PI3K) - AS605204 (200 ng/sítio, i.m.), 5 minutos antes da injeção i.m. de IL-6 (6 ng/sítio). Os animais do grupo controle receberam i.m de solução salina (10 µl, 5 min).

O possível envolvimento de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) na hipernocicepção mecânica induzida pela IL-6 (6 ng/sítio, i.m.) foi também investigado através do pré-tratamento em diferentes grupos experimentais com os seguintes inibidores: SB203580 (30 nmol/sítio, i.m.) para p38 MAPK; PD98059 (30 nmol/sítio, i.m.) para MAPK-ERK quinase MEK-1; SP60015 (30 nmol/sítio, i.m.) para JNK, 5 minutos da administração de IL-6 (6 ng/sítio, i.m.). Os animais do grupo controle receberam i.m de solução salina (10 µl, 5 min).

3.6 Análise histológica

Em uma nova série de experimentos, 3 h após a administração de IL-6 (6 ng/sítio), Cg (100 µg/sítio) ou do veículo, os músculos gastrocnêmios foram removidos e imediatamente fixados em solução de formaldeído 10%. Os tecidos foram emblocados em parafina, seccionados a uma espessura de 7 µm, transferidos para lâminas de vidro e desparafinizados. Para análise histológica geral, as lâminas foram coradas com o uso de hematoxilina e eosina (H&E) e analisadas em microscópio.

3.7 Atividade das enzimas mieloperoxidase e n-acetilglucosaminidase

A migração de neutrófilos e macrófagos para o tecido muscular foi quantificada indiretamente através da atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG), respectivamente. Para isso, os músculos foram removidos, homogeneizados em tampão EDTA/NaCl (pH 4,7) e centrifugados a 10,000 x g por 15 minutos a 4 °C. O precipitado resultante foi resuspenso em tampão 1 gelado (NaCl 0,1 M; NaPO₄ 0,02 M; Na/EDTA 0,015 M; pH 7,4). Foi adicionado, NaCl 0,2 % gelado e após 30 segundos; NaCl 1,6 % contendo glicose 5 % (gelado). A solução foi centrifugada a 10,000 x g por 15 minutos a 4 °C. O precipitado formado foi outra vez resuspenso em tampão 2 gelado (NaPO₄ 0,5 M e 5 % de hexadeciltrimetilamônio (HTAB); pH 5,4), e as amostras obtidas foram congeladas e descongeladas 3 vezes em nitrogênio líquido. Após o último descongelamento, as amostras foram centrifugadas novamente a 10,000 x g por 15 minutos a 4 °C; e 25 µl do sobrenadante foram utilizados para o ensaio de atividade da MPO e NAG. A reação enzimática para MPO foi realizada na presença de tetrametilbenzidina (TMB) 1,6 mM, NaPO₄ 80 mM e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 0,3 mM. A atividade da NAG foi determinada pela adição de 25 µl de p-nitrofenil-2-acetamidaβ-D-glucopiranosida 2,25 mM e 100 µl de tampão citrato (pH 4,5). A absorbância foi medida por espectrofotometria em 690 e 405 nm para MPO e NAG respectivamente, sendo que todos os resultados foram expressos como densidade ótica por miligrama de tecido.

3.8 Dosagem de citocinas

Os níveis teciduais de TNF-α, IL-1β, KC e IL-6 foram avaliados como descrito anteriormente (Bento et al., 2008) com poucas modificações. Os músculos gastrocnêmios foram removidos e homogeneizados com PBS contendo Tween 20 (0,05 %), fluoreto de

fenilmetilsulfonil 0.1 mM, cloreto de benzometônio 0.1 mM, EDTA 10 mM, e aprotinina A 2 ng/ml. O homogenato foi centrifugado a 3,000 x g por 10 minutos a 4 °C, e o sobrenadante armazenado a -70 °C até o momento da análise. Os níveis de citocinas foram determinados utilizando-se Kits específicos de ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay) de acordo com as recomendações do fabricante (R&D Systems). A dosagem de proteínas existentes nas amostras foi realizada segundo o método de Bradford. Os resultados foram expressos por densidade ótica por miligrama de proteína.

3.9 Determinação da fosforilação de MAPK

O preparo das amostras foi realizado como descrito anteriormente para a dosagem de citocinas. As amostras foram diluídas com tampão desnaturante 1/5 (v/v) e armazenadas a -70°C. p-JNK1/2 (T183/Y185), p-p38 MAPK (T180/Y182), e p-ERK1/2 (T202/Y204) foram quantitativamente determinadas através do uso de anticorpos do kit multiplex Flex Set Cytometric Bead Array (Becton Dickinson, RG, Brazil). Resumidamente, diluições seriadas dos padrões foram preparadas utilizando diluentes do ensaio. Subseqüentemente, 50 µl de beads de captura foram adicionados à curva padrão e as amostras. Após 3 h de incubação, 50 µl de reagente de detecção foram adicionados e as amostras incubadas por 1 h. As amostras então foram lavadas com tampão de lavagem, centrifugadas a 800 rpm por 10 min e 150 µl do tampão de lavagem adicionados. A análise por citometria de fluxo foi realizada utilizando o Becton Dickinson FACSCanto II e a análise CBA através do software FCAP (Becton Dickinson). Um total de 900 eventos foi adquirido. Os níveis de detecção mínimos para cada fosfoproteína foram 0,38 U/ml para p-JNK, e 0,64 U/ml para p-p38 MAPK e p-ERK (Schubert et al., 2009).

3.10 Drogas e reagentes

As seguintes drogas foram utilizadas: interleucina-6 recombinante murino, anticorpo anti-TNF- α murino, anticorpo anti-KC murino, antagonista de receptor da interleucina-1, TNF- α , IL-1 β e KC DuoSet kits foram obtidos da R&D Systems (USA); guanetidina, indometacina, SC560, SB366791, aprotinina, hematoxilina, eosina, Cg, EDTA, HTAB, peróxido de hidrogênio, TMB, Tween-20, Tween-80, e parafina, foram adquiridos da Sigma Chemical Company (USA); GF109203X, U73122, PACOCF3, KT-5720, SB203580, PD98059, e SP600125, obtidos da Tocris (U.S.A.). Celecoxibe, formaldeído, NaCl e NaPO₄ todos adquiridos da Merck (Germany); anticorpo anti-

macrófago obtido da Accurate Chemicals (U.S.A.). SB225002 foi sintetizado de acordo com White e colaboradores (1999) com algumas modificações. A síntese do AS605240 foi realizada como descrito anteriormente (Camps et al., 2005).

A IL-6 foi preparada em uma solução contendo 0.1 % de BSA e estocada em tubos plásticos siliconizados a -70°C até o momento do uso. A maioria das drogas, exceto indometacina, SC560, SB225002 e SB366791, foi diluída em solução de NaCl 0,9% (p/v) (salina) antes do uso. A indometacina foi diluída em solução contendo 5 % de carbonato de sódio. O SC560 e o SB225002 foram diluídos em salina com 1% de Tween-80. O SB366791 foi diluído em salina contendo 2% de etanol. Os animais do grupo controle receberam o veículo correspondente ao protocolo experimental empregado.

3.11 Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de 6 animais, exceto os valores de DE50 (doses que produziram 50 % da resposta máxima), que são apresentadas como a média geométrica acompanhada de seus respectivos limites de confiança (95 %). As porcentagens de inibição estão apresentadas como a média \pm erro padrão das inibições obtidas para cada experimento individual. A análise estatística dos experimentos comportamentais foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas, seguida pelo teste de Tukey. Para os dados de MPO, NAG e ELISA, utilizou-se a ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett foi utilizada. Valores de P menores que 0,05 (* $P < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. O valor de DE50 foi determinado por regressão linear a partir de experimentos individuais usando o programa GraphPad Prism 4 (San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.m. de IL-6 em camundongos

Como observado na Figura 1A, a administração i.m. de IL-6 no músculo gastrocnêmio direito de camundongos induziu redução significativa do limiar da resposta mecânica de maneira dose (3, 6 ou 10 ng/sítio) e tempo (1 - 6 h) dependentes, quando comparado ao grupo que recebeu injeção i.m. de salina. A resposta máxima foi observada com a dose de 10 ng/sítio. A hipernocicepção mecânica foi significativa 30 min após a injeção de IL-6 na sua maior dose, e esta resposta foi observada por até 24 h após a injeção de IL-6. O valor médio estimado para a DE50 (acompanhado pelo limite de confiança de 95 %) para este efeito hipernociceptivo foi de 5 (3 - 7) ng/sítio. A dose de 6 ng/sítio foi escolhida para os experimentos seguintes, uma vez que esta foi a dose mais próxima ao valor da DE50 capaz de induzir efeitos reprodutíveis e com menor variação. A Figura 1C demonstra o efeito nociceptivo à estimulação mecânica expresso com base na área sob a curva temporal (0 - 24 h) após a injeção i.m. de IL-6 (3, 6 ou 10 ng/sítio) no músculo gastrocnêmio de camundongos.

O mesmo efeito não foi observado quando avaliado o músculo contralateral destes animais (Figura 1B). A administração i.m. de IL-6 (3, 6 ou 10 ng/sítio) no músculo gastrocnêmio direito não induziu redução significativa do limiar mecânico no músculo contralateral quando comparado ao grupo veículo.

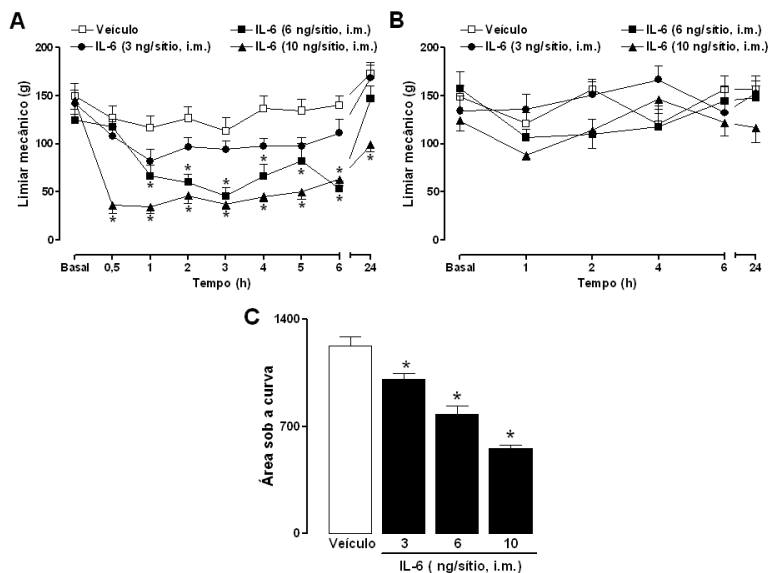


Figura 1 - Hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.m. de IL-6 no músculo gastrocnêmio de camundongos *Swiss*. (A) Curva dose e tempo resposta para a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.m. de IL-6 (3, 6, ou 10 ng/sítio) ou veículo (10 µl de salina, i.m.), no músculo ipsilateral. (B) Curva dose e tempo resposta para a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.m. de IL-6 (3, 6, ou 10 ng/sítio) ou veículo (10 µl de salina, i.m.), no músculo contralateral. (C) Efeito nociceptivo à estimulação mecânica expresso com base na área sob a curva temporal (AUC 0 - 24 h) após a injeção i.m. de IL-6 (3, 6, ou 10 ng/sítio) ou do veículo (10 µl de salina, i.m.). Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo veículo, * $P < 0,05$.

4.2 Envolvimento de mediadores inflamatórios na hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.m. de IL-6

Com o objetivo de investigar a participação de mediadores finais (aminas simpáticas e PGs) na hipernocicepção mecânica induzida pela IL-6, os animais foram previamente tratados com guanetidina ou inibidores seletivos e não seletivos das enzimas ciclooxigenases (COX-1 e/ou COX-2). Os tratamentos sistêmicos com o inibidor não-seletivo das ciclooxigenases, indometacina (5 mg/kg, i.p.), com o inibidor seletivo da COX-2, celecoxibe (30 mg/kg, i.p.), ou com o bloqueador simpatomimético, guanetidina (30 mg/kg, s.c.), resultaram em redução significativa da hipernocicepção mecânica induzida pela IL-6 (6 ng/sítio, i.m.) com inibições de $77 \pm 3 \%$, $83 \pm 6 \%$ e $82 \pm 5 \%$, respectivamente (Figura 2A, B e D). Conforme ilustra a Figura 2C, o pré-tratamento com o inibidor seletivo da COX-1, SC560 (5 mg/kg, i.p.) causou redução parcial da resposta nociceptiva mecânica, apenas 1 h após a administração de IL-6 (6 ng/sítio, i.m.) (Figura 2C). Estes resultados sugerem que as PGs e aminas simpáticas estão envolvidas na hipernocicepção mecânica muscular induzida pela IL-6.

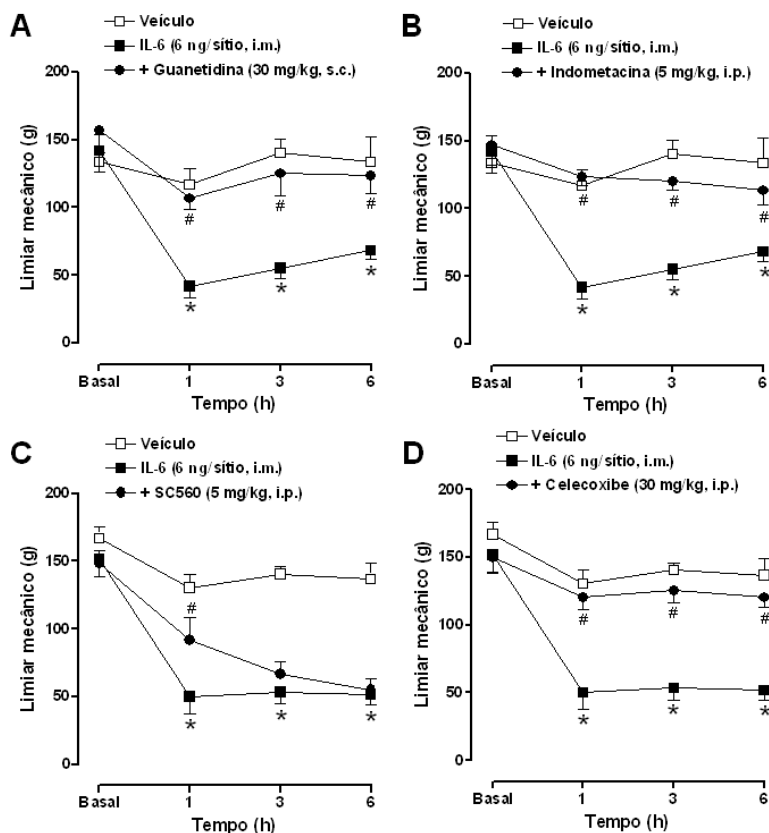


Figura 2 - Efeito do tratamento com bloqueador de aminas simpáticas ou inibidores seletivos e não seletivos das ciclooxigenases sobre a hipernociceção mecânica induzida pela IL-6 no músculo gastrocnêmio de camundongos Swiss. Efeito do tratamento com guanetidina (30 mg/kg, s.c., 30 min.) (A), indometacina (5 mg/kg, i.p., 30 min.) (B), SC560 (5 mg/kg, i.p., 30 min.) (C), ou celecoxibe (30 mg/kg, i.p., 30 min.) (D) sobre a hipernociceção mecânica induzida pela IL-6 (6 ng/sítio, i.m.). Cada grupo representa a média \pm E.P.M. de 6 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo veículo, $*P < 0,05$, ou ao grupo controle (IL-6), $\#P < 0,05$.

4.3 Hipernociceção mecânica induzida pela injeção i.m. de Cg e seu efeito sobre a produção de IL-6 em camundongos

Sabe-se que a injeção i.m. de um agente inflamatório inespecífico, como a Cg, no músculo gastrocnêmio de ratos induz o desenvolvimento da hipernociceção mecânica (Loram et al., 2007). Neste sentido, foi avaliado se a hipernociceção muscular induzida pela Cg levaria a um aumento na produção de IL-6 local. Conforme ilustra a Figura 3A, a administração i.m. de Cg induziu hipernociceção mecânica muscular de maneira dose (30 - 300 µg/sítio, i.m.) e tempo (1 - 6 h) dependentes. A dose de 100 µg/sítio foi escolhida para os experimentos seguintes, uma vez que esta foi a dose com respostas mais próxima daquelas encontradas na resposta nociceptiva mecânica induzida pela IL-6.

Para confirmar o envolvimento da IL-6 na hipernociceção inflamatória induzida pela Cg em camundongos *Swiss*, os níveis desta citocina foram determinados no músculo gastrocnêmio em diferentes tempos. A administração i.m. de Cg (100 µg/sítio) estimulou a produção de IL-6 de maneira significativa (3,9 vezes) na primeira hora após a administração do estímulo inflamatório inespecífico (Figura 3B). Como ilustrado na Figura 4B, os níveis de IL-6 foram detectados até 6 h (3,3 vezes) após a injeção de Cg.

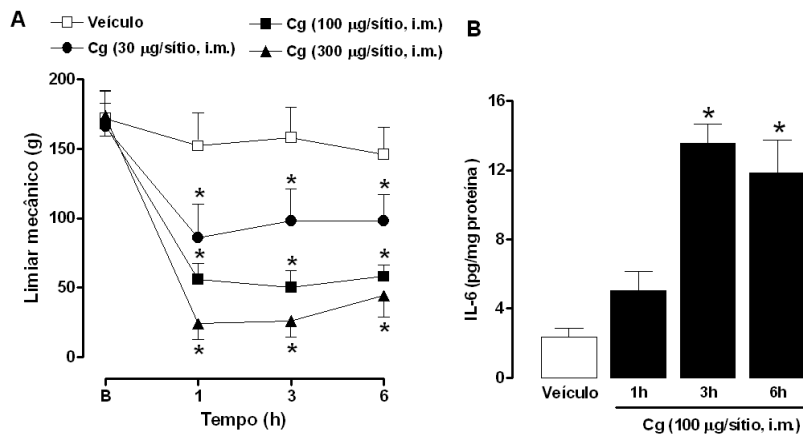


Figura 3 - Hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.m. de Cg e seu efeito sobre a produção de IL-6 no músculo gastrocnêmio de camundongos Swiss. (A) Curva dose e tempo resposta da hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.m. de Cg (30, 100 ou 300 µg/sítio) ou veículo (10 µl de salina, i.m.). (B) Concentração de IL-6 no músculo de camundongos injetadas com Cg (100 µg/sítio, i.m.) ou veículo (10 µl de salina, i.m.). Os níveis das citocinas foram quantificados por ELISA 1, 3 ou 6 h após a administração de Cg ou veículo. Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo veículo, * $P < 0,05$.

4.4 Participação de células inflamatórias na hipernociceção mecânica induzida pela injeção i.m. de IL-6

Nesta série de experimentos foi avaliada a possível participação de células inflamatórias na hipernociceção mecânica induzida pela injeção i.m. de IL-6, já que diversos estudos mostram que a mesma induz o influxo destas células para o local de inflamação. Para tal, foi realizada a coloração H&E em cortes histológicos do músculo gastrocnêmio 3 h após a injeção de IL-6 (6 ng/sítio, i.m.), Cg (100 µg /sítio, i.m.), ou veículo (10 µl de salina, i.m.). As análises histológicas dos diferentes grupos experimentais revelaram um infiltrado de células inflamatórias nos músculos injetados com IL-6, ou no controle positivo, Cg, em relação ao grupo que recebeu salina (Figura 4). Além disso, a injeção de IL-6 ou Cg induz uma inflamação transmural. As imagens da Figura 4 demonstram alteração na permeabilidade vascular com aumento na migração de células inflamatórias dos vasos para o tecido muscular dos animais que receberam a injeção i.m. de Cg ou IL-6, quando comparado com o grupo controle (salina).

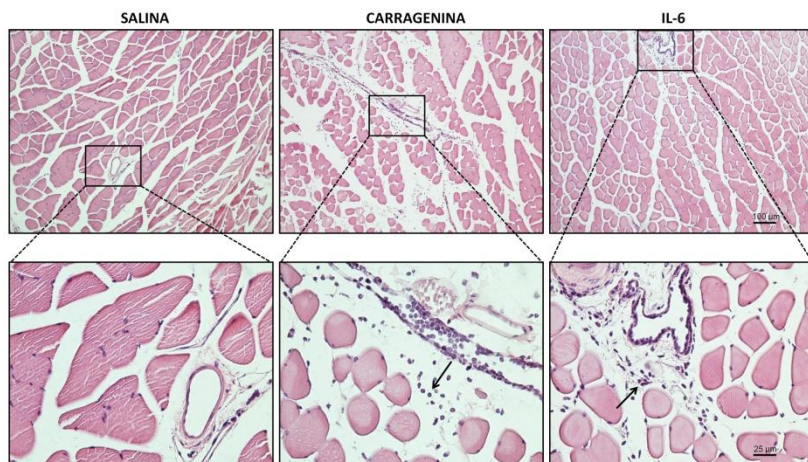


Figura 4 - Análise histológica do músculo gastrocnêmio 3 h após a injeção i.m. de IL-6. Fotomicrografias representativas dos cortes histológicos do tecido muscular fixados com H&E dos grupos: controle (10 µl de salina, i.m.), Cg (100 µg /sítio, i.m.) ou IL-6 (6 ng/sítio, i.m.). Barra equivalente a 100 e 25 µm, respectivamente.

A fim de validar a análise histológica e avaliar a população de células presentes no tecido inflamado, foram quantificadas indiretamente a atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglucosaminidase (NAG) no músculo gastrocnêmio de diferentes grupos experimentais. A administração i.m. de IL-6 (6 ng/sítio) aumentou a atividade da enzima MPO (0,6 vezes) 1 h após a injeção da citocina, aumentando progressivamente, alcançando uma atividade máxima em 6 h (Figura 5A). Por outro lado, a atividade da enzima NAG foi encontrada aumentada (2,8 vezes) 3 h após o estímulo permanecendo elevada até 6 h após a injeção de IL-6 (6 ng/sítio, i.m.) (Figura 5B). Estes resultados sugerem que os neutrófilos foram as primeiras células a migrar para o músculo seguido pelos macrófagos.

Para verificar se estas populações celulares estão envolvidos nas alterações nociceptivas induzidas pela IL-6, camundongos *Swiss* foram pré-tratados com o antagonista seletivo do receptor CXCR2 (SB225002), um receptor de quimiocina conhecido por estar implicado na migração de neutrófilos, ou com o anticorpo anti-macrófago. O pré-tratamento com SB225002 (1 mg / kg, ip, 30 min), causou significativa redução da hipernocicepção mecânica induzida pela IL-6 (6 ng/sítio, i.m.) na terceira ($50\% \pm 2$) e sexta hora ($43\% \pm 3$) após o estímulo inflamatório (Figura 5C), período correspondente aos valores encontrados na atividade da enzima MPO. A depleção de macrófagos, através do tratamento com o anticorpo anti-macrófago (50 µg/kg, i.p., 30 min.), também diminuiu parcialmente a resposta hipernociceptiva mecânica induzida pela IL-6 (6 ng/sítio, i.m.), efeito observado somente em 1 h ($53 \pm 3\%$) após a injeção do agente inflamatório (Figura 5D). Correlacionando esses resultados com os valores da atividade da enzima NAG encontrados, sugere-se que ocorre uma importante participação de macrófagos residentes e não dos infiltrados no músculo durante a hipernocicepção mecânica, uma vez que os níveis de atividade da enzima aumentam apenas 3 h após a injeção i.m. de IL-6.

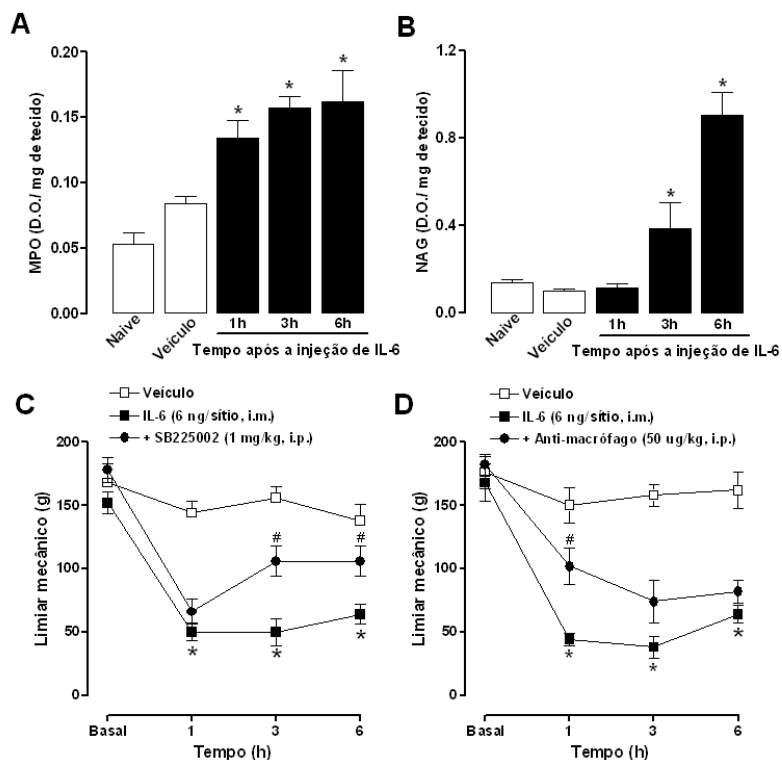


Figura 5 - Efeito da injeção i.m. de IL-6 sobre a infiltração de células inflamatórias no músculo gastrocnêmio de camundongos *Swiss*. Injeção intramuscular de IL-6 (6 ng/sítio) aumenta a atividade das enzimas MPO (A) e NAG (B). Efeito do tratamento com SB225002 (1 mg/kg, i.p., 30 min.) (C), ou anticorpo anti-macrófago (50 µg/kg, i.p., 30 min.) (D) sobre a hiperalgesia mecânica induzida pela IL-6 (6 ng/sítio, i.m.). Cada grupo representa a média \pm E.P.M. de 6 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo veículo, * $P < 0,05$, ou ao grupo controle (IL-6), # $P < 0,05$.

4.5 Participação de citocinas pró-inflamatórias na hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.m de IL-6

Já está bem estabelecido na literatura que neutrófilos e macrófagos estão envolvidos na produção e/ou liberação de citocinas pró-inflamatórias durante uma lesão tecidual, e estas estão envolvidos na gênese e na manutenção da hipernocicepção inflamatória. Além disso, vários estudos demonstram que o TNF- α , IL-1 β e KC (quimiocina derivada de queratinócitos, relacionada a IL-8 humana), são capazes de induzir a migração celular. Sendo assim, para confirmar o envolvimento do TNF- α , KC e IL-1 β na hipernocicepção mecânica induzida pela IL-6, os níveis destas citocinas foram determinados no músculo gastrocnêmio. A injeção de IL-6 (6 ng/sítio, i.m.) estimulou a produção de maneira significativa de TNF- α (1,7 vezes), KC (3,6 vezes) e IL-1 β (1,8 vezes) na primeira hora após a administração desta citocina. Os níveis de TNF- α e KC foram detectados até 3 h, enquanto que os de IL-1 β permaneceram até 6 h após a injeção de IL-6 (Figura 6A, B e C).

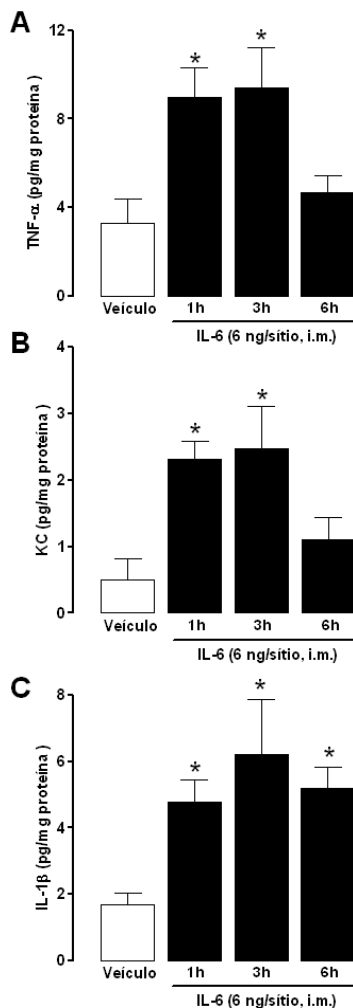


Figura 6 - Efeito da administração i.m. de IL-6 sobre a produção de TNF- α , KC e IL-1 β no músculo gastrocnêmio de camundongos *Swiss*. Concentração de TNF- α (A), KC (B) e IL-1 β (C) no músculo de camundongos injetados com IL-6 (6 ng/sítio, i.m.) ou veículo (10 μ l de salina, i.m.). Os níveis das citocinas foram quantificados por ELISA 1, 3 ou 6 h após a administração de IL-6 ou veículo. Cada grupo representa a média \pm E.P.M. de 6 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo veículo, * $P < 0,05$.

Em uma segunda abordagem, a fim de investigar o envolvimento desses mediadores locais na resposta nociceptiva mecânica induzida pela IL-6, camundongos *Swiss* foram tratados com o anticorpo anti-TNF- α (100 ng/sítio, i.m., 5 min.), anticorpo anti-KC (100 ng/sítio, i.m., 5 min.) ou com IL1-RA (500 ng/sítio, i.m., 5 min.). O tratamento local com os anticorpos anti-TNF- α e anti-KC, ou com IL1-RA reduziram de maneira significativa a resposta hipenociceptiva mecânica induzida pela IL-6 (6 ng/sítio, i.m.) de 1 - 6 h após o estímulo quando comparado ao grupo controle, correspondendo ao período em que os níveis dessas citocinas permanecem elevados. As porcentagens de inibições dos tratamentos com anticorpo anti-TNF- α , anti-KC e IL1-RA foram de $78 \pm 4\%$, $54 \pm 2\%$ e $52 \pm 3\%$, respectivamente (Figura 7B, C e D). Outra estratégia utilizada para verificar a participação do TNF- α na hipernocicepção muscular induzida pela IL-6 (6 ng/sítio, i.m.), foi a utilização de camundongos com deleção gênica para o receptor 1 de TNF- α (TNFR1-/-). Como demonstrado na Figura 7A, a deleção deste receptor reduziu a resposta hipernociceptiva muscular induzida pela IL-6 à estimulação mecânica, semelhante aos resultados comportamentais obtidos pela abordagem farmacológica (Figura 7B).

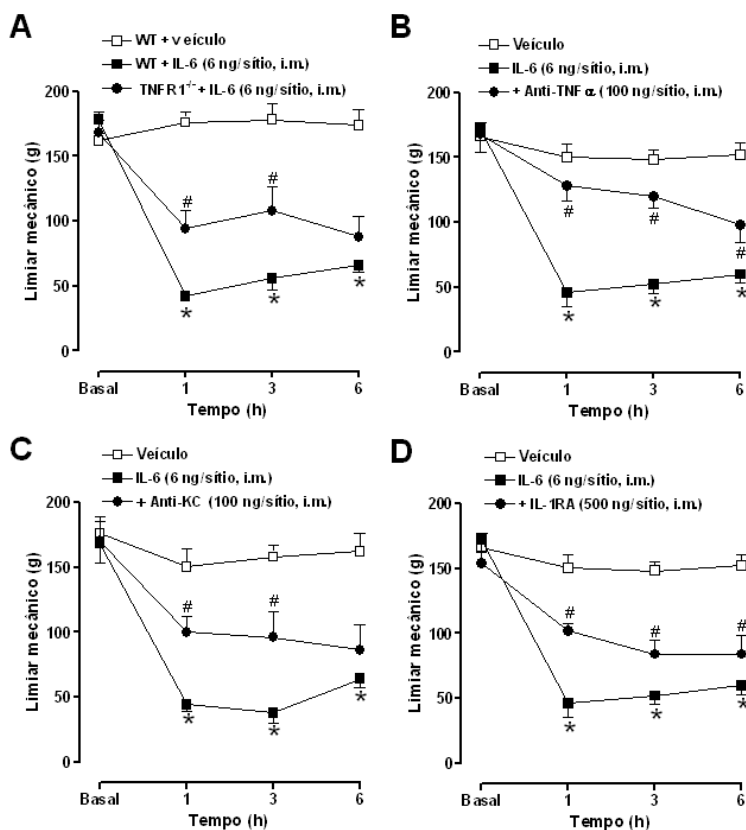


Figura 7 - Envolvimento de citocinas pró-inflamatórias sobre a hipernociceção mecânica induzida pela injeção i.m. de IL-6 em camundongos Swiss. Hipernociceção mecânica induzida pela IL-6 (6 ng/sítio, i.m.) em camundongos TNFR1^{-/-} (A), ou em camundongos Swiss tratados com anticorpo anti-TNF- α (100 ng/sítio, i.m., 5 min.) (B), anticorpo anti-KC (100 ng/sítio, i.m., 5 min.) (C) ou IL-1RA (500 ng/sítio, i.m., 5 min.) (D). Cada grupo representa a média \pm E.P.M. de 6 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo veículo, * $P < 0,05$, ou ao grupo controle (IL-6), # $P < 0,05$.

4.6 Vias de sinalização intracelular envolvidas na hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.m. de IL-6

A fim de avaliar algumas das vias de sinalização intracelular ativadas pela injeção de IL-6 no músculo gastrocnêmio e suas contribuições para a hipernocicepção mecânica, diferentes ferramentas farmacológicas foram empregadas. O pré-tratamento com U73122 (30 pmol/sítio, i.m., 5 min.), inibidor da PLC, inibiu parcialmente a hipernocicepção mecânica induzida pela IL-6 (6 ng/sítio, i.m.) apenas 1 h após a administração do estímulo (Figura 9A), enquanto que os inibidores da PKA (KT-5720- 3 nmol/sítio, i.m., 5 min.) e de PI3K (AS60524 - 200 ng/sítio, i.m., 5 min.) tiveram efeito mais prolongado sobre a resposta hipernociceptiva mecânica, sendo observado até 3 h após a injeção da IL-6 (Figura 8B e C, respectivamente). Por outro lado, o pré-tratamento com o inibidor de PKC, GF1090203X (1 nmol/sítio, i.m., 5 min.), reverteu a hipernocicepção mecânica induzida pela IL-6 (6 ng/sítio, i.m.) 3 - 6 h após o estímulo inflamatório (Figura 8D), sugerindo a participação da PKC numa fase posterior da nocicepção induzida pela IL-6. Além disso, camundongos *Swiss* pré-tratados com PACOCF3 (1 nmol/sítio, i.m., 5 min.), inibidor de PLA₂, apresentaram redução significativa na hipernocicepção mecânica induzida pela IL-6 (6 ng/sítio, i.m.) em todo o período (1 - 6 h) de avaliação, sugerindo um envolvimento desta via em toda a resposta nociceptiva (Figura 8E). As porcentagens de inibição observadas foram: $46 \pm 3\%$ para U73122 em 1 h, $51 \pm 4\%$ para KT-5720 em 3 h; $92 \pm 2\%$ para AS60524 em 3 h; $50 \pm 3\%$ para GF1090203X em 3 h e $68 \pm 5\%$ para PACOCF3 em 3 h.

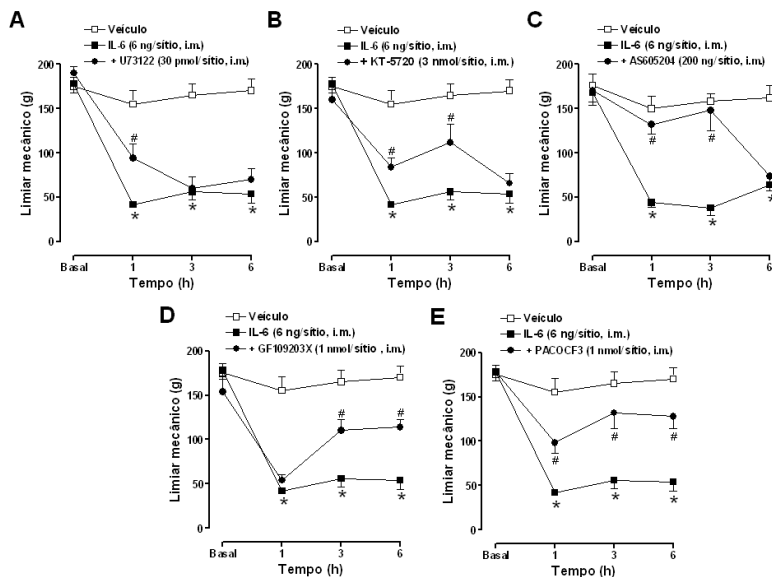


Figura 8 - Vias de sinalização intracelular envolvidas na hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.m. de IL-6 em camundongos *Swiss*. Efeito do tratamento com os inibidores de: fosfolipase C (PLC) - U73122 (30 pmol/sítio, i.m., 5 min.) (A); proteína quinase A (PKA) - KT-5720 (3 nmol/sítio, i.m., 5 min.) (B); fosfatidilinositol quinase (PI3K) - AS605204 (200 ng/sítio, i.m., 5 min.) (C); proteína quinase C (PKC) - GF109203X (1 nmol/sítio, i.m., 5 min.) (D) ou fosfolipase A₂ (PLA₂) - PACOCF3 (1 nmol/sítio, i.m., 5 min.) (E) sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela IL-6 (6 ng/sítio, i.m.). Cada grupo representa a média \pm E.P.M. de 6 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo veículo, * P < 0,05, ou ao grupo controle (IL-6), # P < 0,05.

Para verificar o papel das MAPKs na resposta induzida pela administração i.m. de IL-6, foram utilizados o ensaio de citometria de fluxo ou o tratamento com os inibidores seletivos da ERK, JNK e p38 MAPK. A injeção de IL-6 (6 ng/sítio, i.m.) resultou em aumento da fosforilação de ERK, p38 MAPK e JNK em células musculares 5 min após a administração do estímulo (Figura 9A, B e C). No entanto, o aumento da fosforilação dessas MAPKs foi detectado até 3 h após a administração de IL-6 apenas para a p38 e JNK (Figura 9B e C).

Através do emprego dos inibidores seletivos da ERK, p38 e JNK, foi investigado o possível envolvimento destas na resposta nociceptiva mecânica induzida pela IL-6 (6 ng/sítio, i.m.). Conforme ilustra a Figura 9D e E, os inibidores seletivos da ERK, PD98059 (30 nmol/sítio, i.m., 5 min.), e p38 MAPK, SB203580 (30 nmol/sítio, i.m., 5 min.) reduziram parcialmente a resposta nociceptiva mecânica de 1 - 6 h após a injeção i.m. de IL-6 (inibição de $39 \pm 2\%$ e $38 \pm 3\%$ em 1 h, respectivamente). Resultados similares foram obtidos para o inibidor seletivo de JNK, SP60015 (30 nmol/sítio, i.m., 5 min.), que preveniu substancialmente a hipernocicepção mecânica induzida pela IL-6 1 h ($94 \pm 2\%$ de inibição) após a estimulação (Figura 9F).

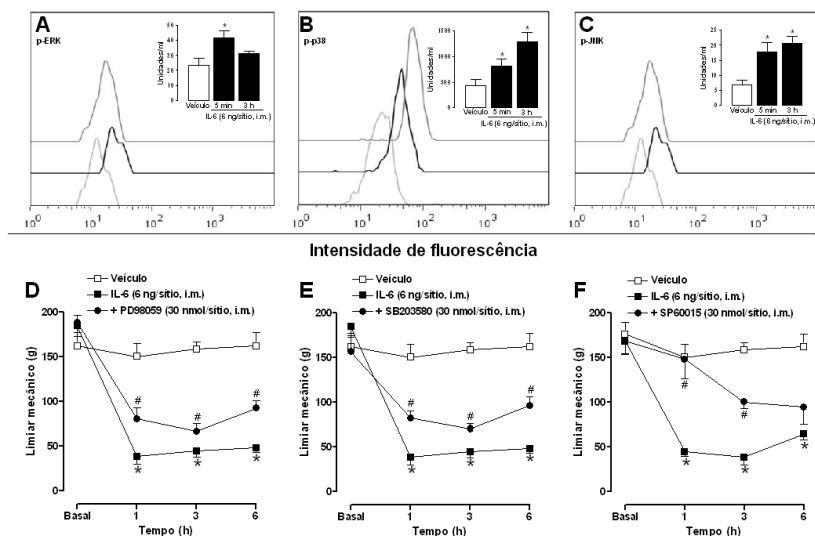


Figura 9 - Envolvimento das MAPKs na hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.m. de IL-6 em camundongos *Swiss*. Efeito da administração i.m. de IL-6 (6 ng/sítio) ou veículo (10 µl de salina) sobre a fosforilação de ERK (A), p-38 MAPK (B) e JNK (C) no músculo gastrocnêmio de camundongos *Swiss*. Efeito do tratamento com os inibidores de: ERK - PD98059 (30 nmol/sítio, i.m., 5 min.) (D); p38 MAPK - SB203580 (30 nmol/sítio, i.m., 5 min.) (E), ou JNK - SP60015 (30 nmol/sítio, i.m., 5 min.) (F) sobre a hipernocicepção mecânica induzida pela IL-6 (6 ng/sítio, i.m.). Cada grupo representa a média ± E.P.M. de 6 animais. Os asteriscos indicam o nível de significância em comparação ao grupo veículo, * $P < 0,05$, ou ao grupo controle (IL-6), # $P < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

Estudos recentes indicam que a IL-6 é liberada localmente na musculatura esquelética após a contração muscular (Jonsdottir et al., 2000; Steensberg et al., 2000; Pedersen et al., 2007), e que o exercício físico por esforço repetitivo produz grandes quantidades de IL-6, que, por sua vez, pode causar inflamação e consequentemente dor muscular (Yassi, 1997; Melhorn et al., 1998; Latko et al., 1999; Stauber, 2004). De fato, a administração i.pl. de IL-6 causa hipernocicepção mecânica em ratos (Cunha et al., 1992). Além disso, foi demonstrado que a injeção de IL-6 no músculo gastrocnêmio de ratos causa hipernocicepção mecânica muscular, efeito que foi observado até 120 h após sua administração (Dina et al., 2008a). De maneira interessante, confirmando e estendendo os dados da literatura, o presente estudo demonstra que a injeção de IL-6 no músculo gastrocnêmio direito de camundongos causou hipernocicepção mecânica muscular. Estes dados mostram que a injeção de IL-6 causou redução do limiar nociceptivo mecânico, sendo este efeito dose e tempo dependentes. Curiosamente, o perfil temporal da resposta nociceptiva à estimulação mecânica observado em camundongos após a injeção i.m. de IL-6 difere daquele em ratos, uma vez que 24 h após da administração da citocina a sensibilidade mecânica retorna aos níveis basais, sugerindo possíveis diferenças da nocicepção mecânica entre as espécies. Estes dados nos permitem sugerir que a injeção i.m. de IL-6 pode ser usada como um modelo experimental reprodutível para o estudo de mecanismos relacionados à transmissão da sensação dolorosa muscular em animais de experimentação.

Assim como a maioria das citocinas, a IL-6 apresenta múltiplas funções biológicas tais como diferenciação, sobrevivência, crescimento e metabolismo celular, processos inflamatórios. Desta forma, já está bem estabelecido que as citocinas constituem uma ligação entre a lesão celular ou reconhecimento de substâncias pelo sistema imunológico e o desenvolvimento de manifestações inflamatórias locais ou sistêmicas (Hopkins, 2003; Cunha e Ferreira, 2003; Verri et al., 2006). Durante o reconhecimento dos estímulos inflamatórios, células residentes e migratórias liberam citocinas que desempenham papel crucial para o desenvolvimento da dor inflamatória, bem como em outros eventos inflamatórios (Cunha et al., 1992; Cunha et al., 2005; para revisão ver Verri et al., 2006). Frente a estas evidências, o presente estudo investigou o papel da IL-6 no desenvolvimento da hipernocicepção

inflamatória muscular. Para tal, diferentes estratégias farmacológicas e bioquímicas foram utilizadas.

Como observado em diversos trabalhos descritos na literatura, durante o desenvolvimento do processo inflamatório ocorre massiva infiltração de células inflamatórias para o sítio lesionado (Delves e Roitt, 2000; Vivier e Malissen, 2005). No presente estudo foi observado um elevado infiltrado celular 3 h após a injeção i.m. de IL-6 ou de Cg através da análise histológica (H&E). Contrariamente, Schäfers e colaboradores (2003) demonstraram que a injeção i.m. de TNF- α , uma importante citocina pró-inflamatória no recrutamento celular, não apresenta dano tecidual, nem migração de leucócitos. Porém, dados prévios da literatura mostram que assim como em muitos outros tecidos inflamados, no músculo esquelético lesado também ocorre uma importante infiltração celular, caracterizada pelo recrutamento primeiramente de neutrófilos, seguidos pelos macrófagos (Raj et al., 1998; Brickson et al. 2001; Tidball, 2005; Toumi et al., 2006). De fato, os resultados do presente trabalho demonstram que a administração de IL-6 no músculo gastrocnêmio resulta em processo inflamatório, caracterizado por influxo de neutrófilos seguidos pelos macrófagos no tecido muscular, verificado através dos ensaios da MPO e NAG, respectivamente.

A MPO está presente nos grânulos do citoplasma dos neutrófilos ativados, onde é responsável pela destruição dos microorganismos que são fagocitados por essas células, clivando estes agentes externos em pequenos peptídeos (Nauseef, 2007). Esta enzima é fundamental na regulação da explosão respiratória nos neutrófilos, entretanto, pode ser altamente tóxica aos tecidos (Edwards e Swan, 1986). Desta forma, o aumento da atividade da enzima é um indicativo indireto da migração de neutrófilos para o local da inflamação (Winterbourn et al., 2000; Faurschou e Borregaard, 2003). O influxo de neutrófilos, observado após a administração de IL-6, apresentou aumento em 1 h após o estímulo inflamatório, mantendo-se significativo até 6 h. Resultados similares foram encontrados no ensaio da atividade da enzima NAG, indicativo indireto da migração de macrófagos, porém este aumento foi significativo 3 h após o estímulo, permanecendo elevada até 6 h após a injeção de IL-6.

Esta sequência de migração celular é em parte explicada pela cinética de expressão de quimiocinas e, possivelmente, de moléculas de adesão, que diferencialmente regulam a infiltração de células inflamatórias. Neste sentido, trabalhos prévios da literatura demonstram que a IL-6 induz a liberação de quimiocinas, bem como a expressão de

moléculas de adesão, ambas envolvidas no processo de recrutamento de neutrófilos e macrófagos (Modur et al., 1997; Romano et al., 1997; Klouche et al., 2000). Adicionalmente, o presente estudo demonstrou aumento nos níveis da quimiocina KC (quimiocina derivada de queratinócitos; quimiocina relacionada com IL-8 de humanos e CINC-1 em ratos) e também das citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-1 β , no músculo gastrocnêmio de camundongos após a injeção de IL-6. Estes mediadores pró-inflamatórios são amplamente conhecidos por estarem envolvidos nos mecanismos que regulam o tráfego de leucócitos para o sítio inflamatório (Verri et al., 2006). Ademais, é importante mencionar que alguns grupos de pesquisas sugerem que a interação da IL-6 e seu receptor solúvel estaria envolvida na supressão de neutrófilos, presentes nas fases iniciais da inflamação, sendo sucedidos e substituídos por macrófagos (Hurst et al., 2001; Marin et al., 2001).

Recentemente, alguns trabalhos demonstraram que o aumento de células inflamatórias no sítio de lesão pode estar relacionado ao desenvolvimento de processos dolorosos (Liu et al., 2000; Lavich et al., 2006; Cunha et al., 2008b). Sendo assim, o presente estudo avaliou se o influxo celular observado no músculo gastrocnêmio após a administração de IL-6 contribuiria para o desenvolvimento da hipernocicepção mecânica. O pré-tratamento sistêmico com o antagonista seletivo para o receptor CXCR2, um receptor de quimiocina conhecido por estar implicado na migração e ativação de neutrófilos em vários modelos de inflamação (Bizzarri et al., 2006; Busch-Petersen, 2006; Reutershan, 2006; Bento et al., 2008), causou significativa redução da hipernocicepção mecânica induzida pela IL-6, período correspondente aos valores encontrados na atividade da enzima MPO. Estes dados sugerem, portanto, que os neutrófilos exercem um papel crucial na liberação de mediadores envolvidos na hipernocicepção desencadeada pela administração de IL-6 no músculo gastrocnêmio de camundongos. Corroborando com estes resultados, dados do nosso grupo demonstraram que o efeito antinociceptivo do tratamento com SB225002, um antagonista seletivo do receptor CXCR2, quando avaliado em diferentes modelos comportamentais de dor aguda e persistente. Além disso, o tratamento i.p. com o SB225002 reduziu de maneira significativa a atividade da enzima MPO, bem como os níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e KC após a injeção intraplantar de carragenina em camundongos (Manjavachi et al., 2010). Ainda, foi demonstrado previamente que o tratamento com o inibidor alostérico não-competitivo dos receptores CXCR1/2, DF 2162, inibiu a infiltração de neutrófilos, assim como a hipernocicepção inflamatória

induzida pela Cg, lipopolissacarídeo e zymosan em camundongos (Cunha et al., 2008a). Assim, os resultados do presente trabalho confirmam e estendem os dados da literatura acerca do envolvimento de neutrófilos na resposta nociceptiva em camundongos.

O recrutamento de macrófagos está temporalmente relacionado com o desenvolvimento de hipernocicepção após lesão nervosa (Myers et al., 1996), e esta contribuição é, em parte, explicada pelo fato de que os macrófagos produzem mediadores inflamatórios como citocinas, cininas e PGs (Nielsen et al., 1994; Tracey and Walker, 1995). Em modelos animais de dor neuropática, a depleção de macrófagos, pelo emprego da injeção sistêmica de clodronato, diminuiu a nocicepção térmica induzida pela ligação do nervo ciático (Liu et al., 2000). Ainda, em estudo recente Mert e colaboradores (2009) relataram que a depleção de macrófagos reduziu a hipernocicepção mecânica em modelo de dor neuropática em ratos diabéticos. De fato, os resultados do presente trabalho indicam que a depleção de macrófagos, utilizando anticorpo anti-macróforo reduziu significativamente a hipernocicepção mecânica induzida pela IL-6. Esta abordagem, no entanto, só foi eficaz quando avaliada 1 h após a injeção desta citocina, sugerindo um importante papel de macrófagos residentes, mas não dos emigrados, no desenvolvimento da nocicepção muscular à estimulação mecânica. Curiosamente, um estudo recente do nosso grupo demonstrou que os efeitos hipernociceptivos do fator ativador de plaquetas (PAF) administrado na pata de ratos não são reduzidos pelo pré-tratamento com anticorpo antimacróforo (Marotta et al., 2009). Deste modo, pode-se sugerir que a participação de macrófagos no desenvolvimento da nocicepção parece ser dependente do modelo experimental utilizado.

Já está bem estabelecido que os níveis endógenos de citocinas estão aumentados em muitas condições musculares dolorosas, como por exemplo, na miopatia inflamatória (Lepidi et al., 1998; Lundberg et al., 2000) e na fibromialgia (Maes et al., 1999; Wallace et al., 2001). Como mencionado anteriormente, a liberação de citocinas desempenha papel essencial no desenvolvimento da dor inflamatória (Cunha et al., 1992; Cunha e Ferreira, 2003; Cunha et al., 2005; para revisão ver Verri et al., 2006). Além disso, é importante salientar que Cunha e colaboradores (2005) relataram a participação de citocinas pró-inflamatórias na hipernocicepção mecânica induzida pela Cg, e ainda que as mesmas medeiam a liberação de aminas simpáticas e PGs, considerados os mediadores finais da hipernocicepção inflamatória. No entanto, foi demonstrado recentemente que a carragenina administrada no músculo gastrocnêmio de ratos não altera os níveis de TNF- α no mesmo tecido,

porém os níveis de IL-6 e IL-1 β encontram-se aumentados 6 e 24h, respectivamente, após o estímulo inflamatório (Loram et al., 2007).

Nossos achados fornecem evidências a respeito do envolvimento de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β e KC, na hipernocicepção mecânica muscular, uma vez que os resultados demonstraram claramente que os níveis de TNF- α e KC estão aumentados no tecido muscular até 3 h após o estímulo inflamatório. No entanto, os níveis de IL-1 β permaneceram aumentados até a sexta hora após a injeção i.m. de IL-6. Esta cinética de produção de citocinas pode sugerir que as células residentes e o influxo de neutrófilos estão envolvidos na liberação de TNF- α , IL-1 β e KC após a injeção de IL-6 no músculo gastrocnêmio. Além disso, o tratamento com os anticorpos anti-TNF- α , anti-KC, ou IL1-RA, diminuiu significativamente a hipernocicepção induzida pela IL-6, em tempos correspondentes ao período em que os níveis destas citocinas apresentaram-se elevados. Resultados muito semelhantes foram obtidos em animais com deleção gênica do TNFR1. Vale ressaltar que o TNFR1 tem sido descrito como o receptor responsável por alguns efeitos do TNF- α , como participação na dor neuropática induzida pela ligadura do nervo ciático, bem como na migração de neutrófilos para o foco inflamatório (Sommer et al., 1998; Canetti et al., 2001). De maneira interessante, Cunha e colaboradores (1992) demonstraram que uma cascata de citocinas, entre elas a IL-6, medeia a hipernocicepção inflamatória mecânica em ratos. Além disso, foi observado que a injeção i.pl. de IL-6 causou hipernocicepção mecânica, um efeito que foi dose e tempo dependente, e que esta medeia a liberação local de IL-1 β , indizindo a liberação de PGs (Cunha et al., 1992). Neste sentido, os resultados do presente trabalho sugerem não apenas o papel relevante exercido pela IL-6 como um mediador que pode desencadear a liberação de uma cascata de citocinas levando a hipernocicepção mecânica muscular, mas também destacar a participação destas citocinas (TNF- α , IL-1 β e KC) no presente fenômeno.

Há um consenso geral na literatura que a hipernocicepção inflamatória ocorre, pelo menos em parte, como consequência da sensibilização dos nociceptores aferentes primários. De fato, após lesão tecidual, células inflamatórias como macrófagos, mastócitos, neutrófilos, plaquetas, bem como células neuronais expressam e liberam uma grande variedade de mediadores e proteínas, com potencial nociceptivo. Dentre estas moléculas destacam-se: citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β), neuropeptídeos (SP, NKA e CGRP), cininas, prótons (H⁺), ATP, ciclooxigenase (COX)-2 e seus produtos

(PGE₂), (para revisão ver Basbaum et al., 2009; Costigan et al., 2009). Como mencionado anteriormente, em estudo recente, foi sugerido que a hipernocicepção inflamatória mecânica induzida pela administração i.pl. de Cg em camundongos tem como mediadores finais as PGs e as aminas simpáticas, precedida da liberação de citocinas pró-inflamatórias (Cunha et al., 2005). Ainda, Cunha e colaboradores (1992) demonstram que a hipernocicepção mecânica induzida pela IL-6 em ratos foi reduzida pelo pré-tratamento com indometacina, mas não com atenolol, indicando uma participação de PGs, e não de aminas simpáticas.

Os resultados obtidos no presente estudo com os inibidores não-seletivo para a COX-1/-2 (indometacina) e seletivo para COX-1 (celecoxibe) na resposta hipernociceptiva induzida pela IL-6, indicam a participação de prostanóides neste modelo, uma vez que o tratamento com ambas as drogas reduziu a nocicepção mecânica induzida por esta citocina. Por outro lado, o tratamento com o inibidor seletivo para a COX-2 não apresentou o mesmo perfil farmacológico, descartando a participação desta enzima na hipernocicepção mecânica muscular induzida pela IL-6. As PGs são consideradas importantes mediadores inflamatórios e nociceptivos, sintetizados por uma variedade de células em resposta a estímulos inflamatórios (Bos et al., 2004; Hata e Breyer, 2004). Enquanto muitos mediadores químicos e neurotransmissores são estocados em vesículas, o ácido araquidônico, precursor das PGs, está localizado na membrana celular. Frente a um estímulo inflamatório, o ácido araquidônico é clivado pela PLA₂ e, uma vez liberado, pode sofrer a ação de duas isoformas da enzima COX, chamadas COX-1 e COX-2 (Ito et al., 2001). Estas enzimas apresentam diferenças no perfil de expressão na maioria dos tecidos do organismo. Enquanto a COX-1 é geralmente encontrada expressa de forma constitutiva na maioria dos tecidos, a enzima COX-2 pode ter sua expressão induzida em uma grande variedade de células pela ação de diferentes estímulos inflamatórios (para revisão, ver Dubois et al., 1998). Ademais, confirmando e estendendo os dados em relação à participação das PGs no presente modelo, o tratamento com o inibidor de PLA₂ também inibiu de maneira significativa a hipernocicepção mecânica induzida pela IL-6. No entanto, ao contrário dos dados da literatura, os resultados do presente trabalho demonstram que o agente bloqueador simpatomimético, guanetidina, inibiu a hipernocicepção muscular induzida pela citocina, reforçando a hipótese de que as aminas simpáticas exercem efeito importante na sensibilização de nociceptores na musculatura estriada.

As proteínas quinases são importantes transdutores de sinal intracelular e desempenham um papel fundamental na regulação da plasticidade neuronal, bem como, nas respostas inflamatórias. Além disso, alguns estudos também têm sugerido a participação das múltiplas isoformas de proteínas quinases na regulação periférica e central nos processos nociceptivos (Petersen-Zeitz e Basbaum, 1999; Obata e Noguchi, 2004; Ferreira et al., 2005). Os resultados do presente estudo demonstram que a inibição da PKA diminui significativamente a resposta nociceptiva induzida pela IL-6 no músculo gastrocnêmio. A PKA é uma enzima que contém duas subunidades regulatórias e duas catalíticas, e é ativada pelo AMP cíclico (AMPC), e está relacionada a diversos processos dolorosos (Otuki et al., 2005). Em neurônios nociceptivos primários, já foi demonstrado que o aumento dos níveis de AMPC está associado à ativação da PKA, tanto em modelos *in vitro*, quanto e *in vivo* (Distler et al., 2005; Wang et al., 2007). Ainda, Cunha e colaboradores (1999) relataram que o aumento intracelular de AMPC potencializa a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.pl. de IL-6 em ratos. É importante mencionar, que recentemente foi demonstrado a participação da PGE₂ na hipernocicepção em resposta a estimulação mecânica, tanto em seres humanos como em modelos animais i (Taiwo e Levine, 1991; Schnizler et al., 2008), e que esta resposta está intimamente relacionada ao aumento de AMPC em neurônios (Aley e Levine, 1999; Sachs et al., 2009). Além disso, foi relatado que a PKA participa da resposta nociceptiva inflamatória induzida por PGE₂ em camundongos (Kassuya et al., 2007).

No presente trabalho, o tratamento com os inibidores seletivos para a PLC, U73122, ou para PKC, GF109203X, administrados localmente, inibiram parcialmente, porém de maneira significativa a hipernocicepção mecânica muscular apenas 1 h ou a partir da terceira hora após a injeção do estímulo inflamatório, respectivamente. Neste sentido, os resultados do presente trabalho sugerem que a hipernocicepção mecânica induzida pela IL-6 no músculo gastrocnêmio depende, em parte, da ativação da via PLC-PKC. Além disso, alguns estudos têm sugerido a participação de diferentes isoformas da PKC tanto na nocicepção aguda como na hipernocicepção crônica (Parada et al., 2003; Ferreira et al., 2005). Ademais, Dina e colaboradores (2008b) demonstraram que a hipernocicepção inflamatória induzida pela administração i.m. de carragenina que resulta em uma hipernocicepção crônica latente em ratos, é dependente da isoforma PKC ϵ . Esta hipernocicepção crônica latente foi revertida e, também prevenida pela injeção intratecal do antisense oligodeoxinucleotídeo para a PKC ϵ , a

qual reduz a expressão desta enzima, produzindo assim um bloqueio funcional da atividade da PKC ϵ neuronal (Dina et al., 2008b). Sendo assim, os resultados do presente trabalho obtidos com os inibidores seletivos da PKA e PKC sugerem que estas quinases têm cinéticas de ativação diferentes no modelo de dor muscular induzida pela IL-6 em camundongos, sendo que a PKA parece estar envolvida no início da hipernocicepção, enquanto PKC é ativada posteriormente.

A PI3K é uma enzima que fosforila o anel da fosfatidilinositol gerando três diferentes segundos mensageiros (Toker e Newton, 2000), que tem como principais funções conduzir a transcrição do NF- κ B induzida pelo TNF- α e IL-1 β (Sizemore et al., 1999; Reddy et al., 2000). Neste sentido, sua participação na dor inflamatória e crônica tem sido elucidada, uma vez que a PI3K parece estar envolvida no controle de uma série de estímulos pró-inflamatórios e também nociceptivos (Zhuang et al., 2004; Xu et al., 2007; Pezet et al., 2008). De maneira semelhante aos dados da literatura, os resultados do presente trabalho demonstram que a inibição da PI3K resultou em redução significativa da resposta nociceptiva induzida pela IL-6, e ainda sugerem que a hipernocicepção mecânica muscular está extremamente associada com a ativação inicial da PI3K. Corroborando com nossos resultados, uma recente publicação relatou a capacidade da IL-6 em ativar a PI3k (Ohbayashi et al., 2007).

As MAPKs exercem papel importante na transdução de sinais intracelulares e desempenham um papel fundamental na regulação da plasticidade neural e as respostas inflamatórias. Tendo estas evidências em vista, inúmeros estudos sobre a participação das MAPKs na regulação da dor têm aumentado nos últimos anos (para revisão ver Ji et al., 2009). As MAPKs são uma família de moléculas sinalizadoras intracelulares, evolutivamente conservadas e compostas por três membros principais: quinase regulada pela sinalização extracelular (ERK, incluindo ERK1/ 2), p38 (incluindo p38, p38 β , p38 γ e p38 δ), e proteína quinase c-Jun N-terminal (JNK, incluindo JNK1, JNK2 e JNK3) (Johnson e Lapadat, 2002). ERK, p38 e JNK representam 3 diferentes cascatas de sinalização que traduzem uma gama de estímulos extracelulares em diversas respostas intracelulares através da regulação transcricional ou não-transcricional (Johnson e Lapadat, 2002; Ji et al., 2009). Os dados do presente trabalho demonstram que a ERK1/2, a p38 e, principalmente JNK, estão particularmente envolvidas na dor muscular causada pela injeção de IL-6, uma vez que os tratamentos com os inibidores seletivos para estas quinases foram eficazes em prevenir a resposta nociceptiva induzida por esta citocina. O pré-tratamento local

com os inibidores seletivos da p38 e ERK1/2 reduziu parcialmente a hipernocicepção mecânica, enquanto o inibidor seletivo da JNK praticamente aboliu o comportamento nociceptivo muscular após a injeção de IL-6. Surpreendentemente, foi observado que a enzima ERK não estava fosforilada 3 h após a administração de IL-6, porém seu inibidor ainda apresentava efeito sobre a hipernocicepção muscular, uma ação que poderia ser explicado pelo bloqueio da ativação de fatores de transcrição. Estes resultados confirmam e estendem dados prévios demonstrando que a IL-6 ativa p38 MAPK, ERK e JNK em diferentes tipos celulares (para revisão ver Heinrich et al., 2003). Ainda, apesar da via de sinalização JAK/STAT3 ser considerada a via de sinalização clássica para a IL-6, e a via alternativa das MAPKs ter pouca relevância para a sinalização da IL-6 em condições fisiológicas, esta via compartilha de proteínas intracelulares que parecem estar envolvidas na potencialização da dor (De Jongh et al., 2003).

Analizados em conjunto, os resultados do presente trabalho demonstram que a administração de IL-6 no músculo gastrocnêmio de camundongos parece promover a ativação de células neuronais e não-neuronais localizadas no músculo, com consequente produção e/ou liberação de diferentes mediadores inflamatórios. Este efeito parece contribuir predominantemente para a ativação de vias sensoriais envolvidas na transmissão de estímulos nociceptivos para estruturas centrais, desencadeando a resposta hipernociceptiva mecânica no músculo. Através de ferramentas farmacológicas e moleculares foi possível demonstrar a participação de células inflamatórias, bem como, de mediadores inflamatórios, além de diferentes vias de sinalização intracelular na hipernocicepção mecânica muscular desencadeada pela IL-6. Além disso, nossos resultados suportam a hipótese de que a IL-6 é a principal citocina produzida e/ou liberada pelo tecido muscular após um estresse celular, podendo estar implicada na patogênese da dor muscular. Finalmente, os resultados deste trabalho sugerem que a injeção de IL-6 no músculo gastrocnêmio de camundongos pode ser utilizada como um modelo experimental reprodutível para o estudo de mecanismos envolvidos na dor muscular inflamatória em roedores. Além disso, a ativação mediada pela IL-6 torna-se um interessante alvo molecular para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas futuras para o tratamento da dor muscular.

6 REFERÊNCIAS

- Aley KO, Levine JD. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. *J Neurosci* 1999;19:2181-6.
- Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res* 2004;1000: 40-56.
- Arendt-Nielsen L, Yarnitsky D. Experimental and clinical applications of quantitative sensory testing applied to skin, muscles and viscera. *J Pain* 2009;10:556-72.
- Bento AF, Leite DF, Claudino RF, Hara DB, Leal PC, Calixto JB. The selective nonpeptide CXCR2 antagonist SB225002 ameliorates acute experimental colitis in mice. *J Leukoc Biol* 2008;84:1213-21.
- Basbaum AE, Jessel TM. The perception of pain. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel, TM. *The principles of Neural Science*. McGraw-Hill: Nova Iorque, 2000; 4ed.:472-791.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* 2009;139:269-84.
- Bizzarri C, Beccari AR, Bertini R, Cavicchia MR, Giorgini S, Allegretti M. ELR+ CXC chemokines and their receptors (CXC chemokine receptor 1 and CXC chemokine receptor 2) as new therapeutic targets. *Pharmacol Ther* 2006;112: 139-49.
- Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:1187-205.
- Brickson S, Hollander J, Corr DT, Ji LL, Best TM. Oxidant production and immune response after stretch injury in skeletal muscle. *Med Sci Sports Exerc* 2001;33:2010-5.
- Burnstock G. Physiology and pathophysiology of purinergic neurotransmission. *Physiol Rev* 2007;87:659-797.
- Busch-Petersen J. Small molecule antagonists of the CXCR2 and CXCR1 chemokine receptors as therapeutic agents for the treatment of inflammatory diseases. *Curr Top Med Chem* 2006;6:1345-52.

- Camps M, Rückle T, Ji H, Ardisson V, Rintelen F, Shaw J, Ferrandi C, Chabert C, Gillieron C, Françon B, Martin T, Gretener D, Perrin D, Leroy D, Vitte PA, Hirsch E, Wymann MP, Cirillo R, Schwarz MK, Rommel C. Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat Med* 2005;11:936-43.
- Canetti C, Silva JS, Ferreira SH, Cunha FQ. Tumor necrosis factor-alpha and leukotriene B4 mediate the neutrophil migration in immune inflammation. *Br J Pharmacol* 2001;134:1619-28.
- Capra NF, Ro JY. Human and animal experimental models of acute and chronic muscle pain: intramuscular algescic injection. *Pain* 2004;110:3-7.
- Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci* 2009;32:1-32.
- Crombie IK, Croft PR, Linton SJ, LeResche L, Von Korff M. Epidemiology of pain. Seattle: IASP Press 1999;4.
- Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1992;107:660-4.
- Cunha FQ, Teixeira MM, Ferreira SH. Pharmacological modulation of secondary mediator systems--cyclic AMP and cyclic GMP--on inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 1999;127:671-8.
- Cunha FQ, Ferreira SH. Peripheral hyperalgesic cytokines. *Adv Exp Med Biol* 2003;521:22-39.
- Cunha TM, Verri WA Jr, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:1755-60.
- Cunha TM, Barsante MM, Guerrero AT, Verri WA Jr, Ferreira SH, Coelho FM, Bertini R, Di Giacinto C, Allegretti M, Cunha FQ, Teixeira MM. Treatment with DF 2162, a non-competitive allosteric inhibitor of

CXCR1/2, diminishes neutrophil influx and inflammatory hypernociception in mice. *Br J Pharmacol* 2008a;154:460-70.

Cunha TM, Verri WA Jr, Schivo IR, Napimoga MH, Parada CA, Poole S, MM Teixeira, Ferreira SH, Cunha FQ. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *J Leukoc Biol* 2008b; 83:824-32.

DeLeo JA, Colburn RW, Nichols M, Malhotra A. Interleukin-6-mediated hyperalgesia/allodynia and increased spinal IL-6 expression in a rat mononeuropathy model. *J Interferon Cytokine Res* 1996;16:695-700.

Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000;343:37-49.

De Jongh RF, Vissers KC, Meert TF, Booij LH, De Deyne CS, Heylen RJ. The role of interleukin-6 in nociception and pain. *Anesth Analg* 2003;96:1096-103.

Dina OA, Green PG, Levine JD. Role of interleukin-6 in chronic muscle hyperalgesic priming. *Neuroscience* 2008a;152:521-5.

Dina OA, Levine JD, Green PG. Muscle inflammation induces a protein kinase Cepsilon-dependent chronic-latent muscle pain. *J Pain* 2008b;9:457-62.

Distler C, Rathee PK, Lips KS, Obreja O, Neuhuber W, Kress M. Fast Ca^{2+} -induced potentiation of heat-activated ionic currents requires cAMP/PKA signaling and functional AKAP anchoring. *J Neurophysiol* 2003;89:2499-505.

Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, Van De Putte LBA, Lipsky PE. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 1998;12: 1063-73.

Edwards SW, Swan TF. Regulation of superoxide generation by myeloperoxidase during the respiratory burst of human neutrophils. *Biochem J* 1986;237:601-4.

Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* 2003;5:1317-27.

Febbraio MA, Pedersen BK. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J* 2002;16:1335-47.

Ferreira J, Trichês KM, Medeiros R, Calixto JB. Mechanisms involved in the nociception produced by peripheral protein kinase c activation in mice. *Pain* 2005; 117:171-81.

Fonseca JE, Santos MJ, Canhão H, Choy E. Interleukin-6 as a key player in systemic inflammation and joint destruction. *Autoimmun Rev* 2009;8:538-42

Gabay C, Silacci P, Genin B, Mentha G, Le Coultre C, Guerne PA. Soluble interleukin-6 receptor strongly increases the production of acute-phase protein by hepatoma cells but exerts minimal changes on human primary hepatocytes. *Eur J Immunol*. 1995 ;25:2378-83.

Gadient RA, Otten U. Postnatal expression of interleukin-6 (IL-6) and IL-6 receptor (IL-6R) mRNAs in rat sympathetic and sensory ganglia. *Brain Res* 1996;724:41-6.

Gebhart GF. Global year against musculoskeletal pain. Disponível em http://www.iaspain.org/AM/Template.cfm?Section=2009_2010_Musculoskeletal_Pain&Template=/CM/HTMLDisplay.cfm&ContentID=9310. Acesso em 10 de novembro de 2009.

Gerdle B, Lemming D, Kristiansen J, Larsson B, Peolsson M, Rosendal L. Biochemical alterations in the trapezius muscle of patients with chronic whiplash associated disorders (WAD) – A microdialysis study. *Eur Journal of Pain* 2008;12 82-93.

Graven-Nielsen T, Mense S. The peripheral apparatus of muscle pain: evidence from animal and human studies. *Clin J Pain* 2001;17:2-10
Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther* 2004;103:147-66.

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003;374:1-20.

Hoheisel U, Reinöhl J, Unger T, Mense S. Acidic pH and capsaicin activate mechanosensitive group IV muscle receptors in the rat. *Pain* 2004;110:149-57.

Hoheisel U, Unger T, Mense S. Excitatory and modulatory effects of inflammatory cytokines and neurotrophins on mechanosensitive group IV muscle afferents in the rat. *Pain* 2005;114:168-76.

Hopkins SJ. The pathophysiological role of cytokines. *LegMed* 2003;1:45-57.

Hunt SP, Mantyh PW. The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci* 2001;2:83-91.

Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Fuller GM, Topley N, Jones SA. IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity* 2001;14:705-14.

Inanici F, Yunus M: History of fibromyalgia: Past to present. *Curr Pain Headache Rep* 2004;8:369-78.

Ito S, Okuda-Ashitaka E, Minami T. Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. *Neurosci Res* 2001;41:299-332.

Ji RR, Gereau RW 4th, Malcangio M, Strichartz GR. MAP kinase and pain. *Brain Res Rev* 2009;60:135-48.

Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 2002;298:1911-12.

Jonsdottir IH, Schjerling P, Ostrowski K, Asp S, Richter EA, Pedersen BK. Muscle contractions induce interleukin-6 mRNA production in rat skeletal muscles. *J Physiol* 2000;528:157-63.

Julius, D., & Basbaum, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 2001;413:203-10.

Kassuya CA, Ferreira J, Claudino RF, Calixto JB. Intraplantar PGE₂ causes nociceptive behaviour and mechanical allodynia: the role of prostanoid E receptors and protein kinases. *Br J Pharmacol* 2007;150:727-37.

Kaufman MP, Hayes SG, Adreani CM, Pickar JG. Discharge properties of group III and IV muscle afferents. *Adv Exp Med Biol* 2002;508:25-32.

Kehl LJ, Fairbanks CA. Experimental Animal Models of Muscle Pain and Analgesia. *Exerc Sport Sci Rev* 2003;31:188-94.

Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* 2005;23:1-21.

Klouché M, Rose-John S, Schmiedt W, Bhakdi S. Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation. *Circulation* 2000;101:1799-805.

Kramer JF, Potter P, Harburn KL, Speechley M, Rollman GB. An upper body musculoskeletal assessment instrument for patients with work-related musculoskeletal disorders: a pilot study. *J Hand Ther* 2001;14:115-21.

Latko WA, Armstrong TJ, Franzblau A, Ulin SS, Werner RA, Albers JW. Cross-sectional study of the relationship between repetitive work and the prevalence of upper limb musculoskeletal disorders. *Am J Ind Med* 1999;36:248-59.

Lavich, T. R., Siqueira Rde, A., Farias-Filho, F. A., Cordeiro, R. S., Rodrigues e Silva, P. M., Martins, M. A. Neutrophil infiltration is implicated in the sustained thermal hyperalgesic response evoked by allergen provocation in actively sensitized rats. *Pain* 2006;125:180-7.

Lee YJ, Heo JS, Suh HN, Lee MY, Han HJ. Interleukin-6 stimulates a-MG uptake in renal proximal tubule cells: Involvement of STAT3, PI3K/Akt, MAPKs, and NF- κ B. *Am J Physiol Renal Physiol* 2007;293:1036-46.

Lepidi H, Frances V, Figarella-Branger D, Bartoli C, Machado-Baeta A, Pellissier JF. Local expression of cytokines in idiopathic inflammatory myopathies. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1998;24:73-9.

Light AR, Huguen RW, Zhang J, Rainier J, Liu Z, Lee J. Dorsal root ganglion neurons innervating skeletal muscle respond to physiological combinations of protons, ATP, and lactate mediated by ASIC, P2X, and TRPV1. *J Neurophysiol* 2008;100:1184-201.

Lipsky PE. Interleukin-6 and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther.* 2006;8:1-5.

Liu T, Rooijenb N, Tracey DJ. Depletion of macrophages reduces axonal degeneration and hyperalgesia following nerve injury. *Pain* 2000;86:25-32.

Loeser JD, Melzack R. Pain: an overview. *Lancet* 1999;353:1607-9.

Loeser JD. What's to be done? Comments on Grabow et al. *Clin J Pain* 2003;19:384.

Loeser JD, Treede RD. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain* 2008; 137:473-77.

Loram LC, Fuller A, Fick LG, Cartmell T, Poole S, Mitchell D. Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. *The Journal of Pain* 2007;8:127-36.

Lundberg IE. The role of cytokines, chemokines, and adhesion molecules in the pathogenesis of idiopathic inflammatory myopathies. *Curr Rheumatol Rep* 2000;2:216-24.

Maes M, Libbrecht I, Van Hunsel F, Lin AH, De Clerck L, Stevens W, Kenis G, de Jongh R, Bosmans E, Neels H. The immune-inflammatory pathophysiology of fibromyalgia: increased serum soluble gp130, the common signal transducer protein of various neurotrophic cytokines. *Psychoneuroendocrinology* 1999;24(4):371-83.

Manjavachi MN, Quintão NL, Campos MM, Deschamps IK, Yunes RA, Nunes RJ, Leal PC, Calixto JB. The effects of the selective and non-peptide CXCR2 receptor antagonist SB225002 on acute and long-lasting models of nociception in mice. *Eur J Pain* 2010;14:23-31.

Marin V, Montero-Julian FA, Grès S, Boulay V, Bongrand P, Farnarier C, Kaplanski G. The IL-6-soluble IL-6Ralpha autocrine loop of endothelial activation as an intermediate between acute and chronic inflammation: an experimental model involving thrombin. *J Immunol* 2001;167:3435-42.

Marotta DM, Costa R, Motta EM, Fernandes ES, Medeiros R, Quintão NL, Campos MM, Calixto JB. Mechanisms underlying the nociceptive responses induced by platelet-activating factor (PAF) in the rat paw. *Biochem Pharmacol* 2009;77:1223-35.

März P, Otten U, Rose-John S. Neural activities of IL-6-type cytokines often depend on soluble cytokine receptors. *Eur J Neurosci* 1999;11:2995-3004.

Melhorn JM. Pain responses in patients with upper-extremity disorders. *J Hand Surg Am.* 1998;23:954-5.

Mense S. Muscle pain: mechanisms and clinical significance. *Dtsch Arztebl Int* 2008;105:214-9.

Mense S. Algesic agents exciting muscle nociceptors. *Exp Brain Res* 2009;196:89-100.

Mert T, Gunay I, Ocal I, Guzel AI, Inal TC, Sencar L, Polat S. Macrophage depletion delays progression of neuropathic pain in diabetic animals. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol* 2009;379:445-52.

Millan MJ. The induction of pain: An integrative review. *Prog Neurobiol* 1999;57:1-64.

Modur V, Li Y, Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Retrograde inflammatory signaling from neutrophils to endothelial cells by soluble interleukin-6 receptor alpha. *J Clin Invest* 1997;100:2752-6.

Motta EM, Calixto JB, Rae GA. Mechanical hyperalgesia induced by endothelin-1 in rats is mediated via phospholipase C, protein kinase C, and MAP kinases. *Exp Biol Med* 2006;231:1141-5.

Myers RR, Heckman HM, Rodriguez M. Reduced hyperalgesia in nerveinjured WLD mice: relationship to nerve fiber phagocytosis, axonal degeneration, and regeneration in normal mice. *Exp Neurol* 1996;141:94-101.

Naussef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol Rev* 2007;219:88-102.

Nielsen BW, Mukaida N, Matsushima K, Kasahara T. Macrophages as producers of chemotactic proinflammatory cytokines. *Immunol Ser* 1994;60:131-42.

Nishimoto N, Kishimoto T. Interleukin 6: from bench to bedside. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006 Nov;2:619-26.

Obata K, Noguchi K. MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. *Life Sci* 2004;74:2643-53.

Ohbayashi N, Ikeda O, Taira O, Yamamoto Y, Muromoto R, Sekine Y, Sugiyama Y, Honjoh T, Matsuda T. LIF- and IL-6-induced acetylation of STAT3 at Lys-685 through PI3K/Akt activation. *Biol Pharm Bull* 2007;30:1860-64.

Ono T, Maekawa K, Watanabe S, Oka H, Kuboki T. Muscle contraction accelerates IL-6 mRNA expression in the rat masseter muscle. *Arch Oral Biol* 2007;52:479-86.

Otuki MF, Ferreira J, Lima FV, Meyre-Silva C, Malheiros A, Muller LA, Cani GS, Santos AR, Yunes RA, Calixto JB. Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;313(1):310-8.

Parada CA, Yeh JJ, Reichling DB, Levine JD. Transient attenuation of protein kinase Cepsilon can terminate a chronic hyperalgesic state in the rat. *Neuroscience* 2003; 120:219-26.

Pedersen BK, Akerstrom TCA, Nielsen AR, Fischer CP. Role of myokines in exercise and metabolism. *J Appl Physiol* 2007;103:1093-8.

Petersen-Zeitz KR, Basbaum AI. Second messengers, the substantia gelatinosa and injury-induced persistent pain. *Pain* 1999;6:5-12.

Pezet S, Marchand F, D'Mello R, Grist J, Clark AK, Malcangio M, Dickenson AH, Williams RJ, McMahon SB. Phosphatidylinositol 3-kinase is a key mediator of central sensitization in painful inflammatory conditions. *J Neurosci* 2008;28:4261-70.

Quintão NL, Balz D, Santos AR, Campos MM, Calixto JB. Long-lasting neuropathic pain induced by brachial plexus injury in mice: Role triggered by the pro-inflammatory cytokine, tumour necrosis factor alpha. *Neuropharmacology* 2006;50:614-20.

Raj DA, Booker TS, Belcastro AN. Striated muscle calcium-stimulated cysteine protease (calpain-like) activity promotes myeloperoxidase activity with exercise. *Pflugers Arch* 1998;435:804-9.

Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1957;111:409-19.

Reddy SA, Huang JH, Liao WS. Phosphatidylinositol 3-kinase as a mediator of TNF-induced NF-kappa B activation. *J Immunol* 2000;164, 1355-63.

Reutershan J. CXCR2 - the receptor to hit? *Drug News Perspect* 2006;19: 615-23.

Rocha AC, Fernandes ES, Quintão NL, Campos MM, Calixto JB. Relevance of tumour necrosis factor-alpha for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carrageenan in the mouse paw. *Br J Pharmacol* 2006;148:688-95.

Romano M, Sironi M, Toniatti C, Polentarutti N, Fruscella P, Ghezzi P, Faggioni R, Luini W, van Hinsbergh V, Sozzani S, Bussolino F, Poli V, Ciliberto G, Mantovani A. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 1997;6:315-25.

Rosendal L, Sjøgaard K, Kjær M, Sjøgaard G, Langberg H, Kristiansen J. Increase in interstitial interleukin-6 of human skeletal muscle with repetitive low-force exercise. *J Appl Physiol* 2005;98:477-81.

Russo CM, Brose WG. Chronic pain. *Ann Rev Med* 1998;49:123-33.
Sachs D, Villarreal C, Cunha F, Parada C, Ferreira S. The role of PKA and PKCepsilon pathways in prostaglandin E2-mediated hypernociception. *Br J Pharmacol* 2009; 156:826-34.

Schäfers M, Sorkinb ML, Sommer C. Intramuscular injection of tumor necrosis factor-alpha induces muscle hyperalgesia in rats. *Pain* 2003;104:579-88.

Schnizler K, Shutov LP, Van Kanegan MJ, Merrill MA, Nichols B, McKnight GS, Strack S, Hell JW, Usachev YM. Protein kinase A anchoring via AKAP150 is essential for TRPV1 modulation by forskolin and prostaglandin E2 in mouse sensory neurons. *J Neurosci* 2008;28:4904-17.

Schubert R, Geiger H, Zielen S, Baer PC. Simultaneous detection of ERK-, p38-, and JNK-MAPK phosphorylation in human adipose-derived stem cells using the Cytometric Bead Array technology. *J Immunol Methods* 2009; Epub ahead of print.

Sizemore N, Leung S, Stark GR. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase in response to interleukin-1 leads to phosphorylation and activation of the NF-kappaB p65/RelA subunit. *Mol Cell Biol* 1999;19:4798-805.

Skøtt O. Pain: New insights, new treatments? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2003;285:R30-31.

Sluka KA, Rasmussen LA. Fatiguing exercise enhances hyperalgesia to muscle inflammation. *Pain* 2009; Epub ahead of print.

Sommer C, Schmidt C, George A. Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. *Exp Neurol* 1998;151:138-42.

Steensberg A, van Hall G, Osada T, Sacchetti M, Saltin B, Klarlund Pedersen B. Production of interleukin-6 in contracting human skeletal

muscles can account for the exercise-induced increase in plasma interleukin-6. *J Physiol* 2000;529:237-42.

Stein C, Schäfer M, Machelska H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nature Med* 2003;9: 1003-8.

Taiwo YO, Levine JD. Further confirmation of the role of adenylyl cyclase and of cAMP-dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. *Neuroscience* 1991;44:131-5.

Takagi N, Mihara M, Moriya Y, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Takeda Y, Ohsugi Y. Blockage of interleukin-6 receptor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:2117-21.

Tidball JG. Inflammatory processes in muscle injury and repair. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005;288:345-53.

Tracey DJ, Walker JS. Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved? *Inflamm Res* 1995;44:407-11.

Toker A, Newton AC. Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell* 2000;103:185-8.

Toumi H, F'guy S, Best TM. The role of neutrophils in injury and repair following muscle stretch. *J Anat* 2006;208:459-70.

Uçeyler N, Schäfers M, Sommer C. Mode of action of cytokines on nociceptive neurons. *Exp Brain Res* 2009;196:67-78.

Vilcek J, Feldmann M. Historical review: Cytokines as therapeutics and targets of therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:201-9.

Vivier E, Malissen B. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. *Nat Immunol* 2005;6:17-21.

Verri WA Jr, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther* 2006;112:116-38.

Wallace DJ, Linker-Israeli M, Hallegua D, Silverman S, Silver D, Weisman MH. Cytokines play an aetiopathogenetic role in

fibromyalgia: a hypothesis and pilot study. *Rheumatology* 2001;40:743-9.

Wang C, Li GW, Huang LY. Prostaglandin E2 potentiation of P2X3 receptor mediated currents in dorsal root ganglion neurons. *Mol Pain* 2007;3:22.

Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol* 2000;7:53-8.

White JR, Lee JM, Young PR, Hertzberg RP, Jurewicz AJ, Chaikin MA, Widdowson K, Foley JJ, Martin LD, Griswold DE, Sarau HM. Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. *J Biol Chem*. 1998;273:10095-8.

Woolf AD, Pfleger B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ* 2003;81:646-56.

Yassi A. Repetitive strain injuries. *Lancet* 1997;349:943-7.

Xu JT, Tu HY, Xin WJ, Liu XG, Zhang GH, Zhai CH. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B/Akt in dorsal root ganglia and spinal cord contributes to the neuropathic pain induced by spinal nerve ligation in rats. *Exp Neurol* 2007;206:269-79.

Xu XJ, Hao JX, Andell-Jonsson S, Poli V, Bartfai T, Wiesenfeld-Hallin Z. Nociceptive responses in interleukin-6-deficient mice to peripheral inflammation and peripheral nerve section. *Cytokine* 1997;9:1028-33.

Zhuang ZY, Xu H, Clapham DE, Ji RR. Phosphatidylinositol 3- kinase activates ERK in primary sensory neurons and mediates inflammatory heat hyperalgesia through TRPV1 sensitization. *J Neurosci* 2004;24: 8300-9.

Zídek Z, Anzenbacher P, Kmoníčková E. Current status and challenges of cytokine pharmacology. *Br J Pharmacol* 2009;157:342-61.